

**ZUR PRODUKTION UND REINIGUNG VON  
STAPHYLOKOKKEN-ENTEROTOXIN D**

**Susanne Charlotte Hartung**

**München 1986**



Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Hygiene und Technologie  
der Lebensmittel tierischen Ursprungs  
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München  
Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan

**Zur Produktion und Reinigung von  
Staphylokokken-Enterotoxin D**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Susanne Charlotte Hartung

aus

Fulda

München 1986

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. H. Zucker

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Prof. Dr. J. Kösters

Tag der Promotion: 25. Juli 1986

|      |                                          |   |
|------|------------------------------------------|---|
| 1    | Einleitung                               | 1 |
| 2    | Grundlagen                               | 2 |
| 2.1  | Grundlagen der Mathematik                | 2 |
| 2.2  | Grundlagen der Physik                    | 2 |
| 2.3  | Grundlagen der Chemie                    | 2 |
| 2.4  | Grundlagen der Biologie                  | 2 |
| 2.5  | Grundlagen der Geographie                | 2 |
| 2.6  | Grundlagen der Geschichte                | 2 |
| 2.7  | Grundlagen der Kunst                     | 2 |
| 2.8  | Grundlagen der Musik                     | 2 |
| 2.9  | Grundlagen der Sportwissenschaft         | 2 |
| 2.10 | Grundlagen der Sozialwissenschaften      | 2 |
| 2.11 | Grundlagen der Rechtswissenschaften      | 2 |
| 2.12 | Grundlagen der Wirtschaftswissenschaften | 2 |
| 2.13 | Grundlagen der Ingenieurwissenschaften   | 2 |
| 2.14 | Grundlagen der Medizinalwissenschaften   | 2 |
| 2.15 | Grundlagen der Pädagogik                 | 2 |
| 2.16 | Grundlagen der Psychologie               | 2 |
| 2.17 | Grundlagen der Philosophie               | 2 |
| 2.18 | Grundlagen der Theologie                 | 2 |
| 2.19 | Grundlagen der Politikwissenschaft       | 2 |
| 2.20 | Grundlagen der Soziologie                | 2 |
| 2.21 | Grundlagen der Anthropologie             | 2 |
| 2.22 | Grundlagen der Ethnologie                | 2 |
| 2.23 | Grundlagen der Linguistik                | 2 |
| 2.24 | Grundlagen der Literaturwissenschaft     | 2 |
| 2.25 | Grundlagen der Medienwissenschaft        | 2 |
| 2.26 | Grundlagen der Informationswissenschaft  | 2 |
| 2.27 | Grundlagen der Umweltwissenschaften      | 2 |
| 2.28 | Grundlagen der Raumwissenschaften        | 2 |
| 2.29 | Grundlagen der Archäologie               | 2 |
| 2.30 | Grundlagen der Paläontologie             | 2 |
| 2.31 | Grundlagen der Zoologie                  | 2 |
| 2.32 | Grundlagen der Botanik                   | 2 |
| 2.33 | Grundlagen der Mikrobiologie             | 2 |
| 2.34 | Grundlagen der Molekularbiologie         | 2 |
| 2.35 | Grundlagen der Zellbiologie              | 2 |
| 2.36 | Grundlagen der Biochemie                 | 2 |
| 2.37 | Grundlagen der Biophysik                 | 2 |
| 2.38 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.39 | Grundlagen der Biomedizin                | 2 |
| 2.40 | Grundlagen der Biotechnologie            | 2 |
| 2.41 | Grundlagen der Bioinformatik             | 2 |
| 2.42 | Grundlagen der Biostatistik              | 2 |
| 2.43 | Grundlagen der Biomathematik             | 2 |
| 2.44 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.45 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.46 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.47 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.48 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.49 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.50 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.51 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.52 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.53 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.54 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.55 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.56 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.57 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.58 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.59 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.60 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.61 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.62 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.63 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.64 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.65 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.66 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.67 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.68 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.69 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.70 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.71 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.72 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.73 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.74 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.75 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.76 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.77 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.78 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.79 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.80 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.81 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.82 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.83 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.84 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.85 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.86 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.87 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.88 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.89 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.90 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.91 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.92 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.93 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.94 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.95 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.96 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.97 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.98 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 2.99 | Grundlagen der Biomechanik               | 2 |
| 3    | Fazit                                    | 3 |

Meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

|         |                                                                                          |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.      | Einleitung                                                                               | 1  |
| 2.      | Schrifttum                                                                               | 2  |
| 2.1     | Staphylokokken-Enterotoxine (SE)                                                         | 2  |
| 2.1.1.  | Allgemeine Eigenschaften                                                                 | 2  |
| 2.1.2   | Spezielle Eigenschaften                                                                  | 5  |
| 2.2     | Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken-Enterotoxin D (SED) und ihre Epidemiologie | 8  |
| 2.2.1   | Beteiligung von SED an Lebensmittelvergiftungen                                          | 8  |
| 2.2.2   | Kontaminationsquellen                                                                    | 10 |
| 2.3     | Reinigung von SE                                                                         | 16 |
| 2.3.1   | Produktion von SE für Reinigungsversuche                                                 | 16 |
| 2.3.2   | Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand                                                 | 18 |
| 2.3.3   | Reinigung von SE mittels Fällungsmethoden                                                | 19 |
| 2.3.4   | Reinigung von SE mittels säulenchromatographischer Methoden                              | 20 |
| 2.3.4.1 | Adsorptionschromatographie                                                               | 20 |
| 2.3.4.2 | Ionenaustauschchromatographie                                                            | 21 |
| 2.3.4.3 | Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)                                                 | 32 |
| 2.3.4.4 | Chromatofokussierung                                                                     | 37 |
| 2.3.4.5 | Affinitätschromatographie                                                                | 38 |
| 2.3.4.6 | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie                                                    | 39 |
| 2.3.5   | Reinigung von SE mittels elektrophoretischer Methoden                                    | 42 |
| 2.3.5.1 | Elektrophorese                                                                           | 42 |
| 2.3.5.2 | Isoelektrische Fokussierung                                                              | 44 |
| 2.3.6   | Konzentrieren, Entsalzen und Äquilbrieren SE-haltiger Lösungen                           | 46 |

|                                                                                     | Seite     |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>3. Eigene Untersuchungen</b>                                                     | <b>48</b> |
| 3.1 Produktion von SED                                                              | 48        |
| 3.1.1 Material                                                                      | 48        |
| 3.1.2 Methodik                                                                      | 49        |
| 3.1.2.1 Quantitativer Nachweis von SED                                              | 49        |
| 3.1.2.2 Prüfung des SED-Bildungsvermögens von <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämmen | 49        |
| 3.1.2.3 Produktion von SED in flüssigen Nährmedien                                  | 50        |
| 3.1.2.3.1 Vorkulturverfahren                                                        | 50        |
| 3.1.2.3.2 Nährmedien                                                                | 50        |
| 3.1.2.3.3 Schüttelgeschwindigkeiten und Inkubationszeiten                           | 51        |
| 3.1.2.3.4 pH-Werte und Bebrütungstemperaturen                                       | 51        |
| 3.1.2.3.5 Zusätze                                                                   | 52        |
| 3.1.2.3.6 Belüftung des Mediums                                                     | 52        |
| 3.1.2.4 Produktion von SED mit dem "sac-culture"-Verfahren                          | 52        |
| 3.1.3 Ergebnisse                                                                    | 53        |
| 3.2 Reinigung von SED                                                               | 58        |
| 3.2.1 Material                                                                      | 58        |
| 3.2.2 Methodik                                                                      | 59        |
| 3.2.2.1 Proteinbestimmung                                                           | 59        |
| 3.2.2.2 Nachweis von SED                                                            | 59        |
| 3.2.2.3 Konzentrieren von SED                                                       | 59        |
| 3.2.2.4 Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand                                   | 60        |
| 3.2.2.4.1 Batchverfahren mit Carboxymethylcellulose CM 52                           | 60        |
| 3.2.2.4.2 Batchverfahren auf Amberlite CG-50 I                                      | 60        |
| 3.2.2.5 Entsalzen mittels Gelfiltration                                             | 61        |
| 3.2.2.6 Chromatofokussierung                                                        | 61        |
| 3.2.2.7 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie                                       | 62        |
| 3.2.2.8 Analyse gereinigter SED-Präparate                                           | 62        |
| 3.2.2.8.1 Isoelektrische Fokussierung                                               | 63        |
| 3.2.2.8.2 SDS-Gelelektrophorese                                                     | 63        |
| 3.2.3 Ergebnisse                                                                    | 64        |
| 3.2.3.1 Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand                                   | 64        |

|         | Seite                                     |
|---------|-------------------------------------------|
| 3.2.3.2 | Entsalzen mittels Gelfiltration           |
|         | 67                                        |
| 3.2.3.3 | Chromatofokussierung                      |
|         | 67                                        |
| 3.2.3.4 | Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie     |
|         | 76                                        |
| 3.3     | Immunisierungsversuche mit SED            |
|         | 79                                        |
| 3.3.1   | Material                                  |
|         | 79                                        |
| 3.3.2   | Methodik                                  |
|         | 79                                        |
| 3.3.2.1 | Immunisierung                             |
|         | 79                                        |
| 3.3.2.2 | Bestimmung präzipitierender Antikörper    |
|         | 79                                        |
| 3.3.3   | Ergebnisse                                |
|         | 80                                        |
| 4.      | Besprechung der Ergebnisse und Diskussion |
|         | 82                                        |
| 5.      | Zusammenfassung / Summary                 |
|         | 96                                        |
| 6.      | Literaturverzeichnis                      |
|         | 100                                       |



## 1. Einleitung

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) sind die Ursache der Staphylokokken-Intoxikation, die weltweit zu den häufigsten mikrobiell bedingten Lebensmittelvergiftungen zählt. Der Nachweis der SE ist aus epidemiologischen Gründen wichtig und dient außerdem dazu, die Erfahrungen hinsichtlich der Prophylaxe der Lebensmittelvergiftung zu vermehren. Für den zuverlässigen serologischen Nachweis erforderliche Reagenzien sind jedoch nur in beschränktem Umfang verfügbar und darüber hinaus sehr teuer. Dies ist primär darauf zurückzuführen, daß SE nur in relativ geringen Mengen gebildet werden und aus dem Rohtoxin erst mittels aufwendiger Reinigungsverfahren zu isolieren sind. Voraussetzung für eine rationelle Gewinnung von SE sind daher Produktions- und Reinigungsverfahren mit möglichst hoher Ergiebigkeit bzw. Ausbeute. Mir wurde die Aufgabe gestellt, geeignete Bedingungen für die Produktion von Enterotoxin D (SED) hinsichtlich Züchtungsverfahren mit großer Ergiebigkeit (Nährmedien, Inkubationsbedingungen etc.) zu ermitteln und die Anwendbarkeit der Chromatofokussierung für die Reinigung von SED mit guten Ausbeuten zu prüfen.

## 2. Schrifttum

### 2.1 Staphylokokken-Enterotoxine

#### 2.1.1 Allgemeine Eigenschaften

Staphylokokken-Enterotoxine (SE) werden unter bestimmten Bedingungen in Lebensmitteln und in geeigneten Nährmedien (BERGDOLL, 1969) hauptsächlich von Koagulase-positiven, gelegentlich auch von Koagulase-negativen Staphylokokken (Staph.-)Stämmen produziert (LACHICA et al., 1969; BERGDOLL, 1972). Die SE rufen nach oraler Aufnahme eine Lebensmittelvergiftung hervor, die nach einer Inkubationszeit von i.d.R. einer bis sechs Stunden mit den typischen Symptomen Übelkeit, Erbrechen, Würgen, abdominale Krämpfe und Durchfall einhergeht. In schweren Fällen können Kopfschmerzen, Muskelkrämpfe, starke Erschöpfungserscheinungen, Fieber oder auch Abfall der Körpertemperatur in subnormale Bereiche, Blutdruckabfall und heftige Nierenschmerzen hinzukommen. Der Grad der Erkrankung hängt von der Menge des aufgenommenen Toxins sowie der Empfindlichkeit der betroffenen Person ab. In der Regel erholt sich der Patient jedoch ohne ärztliche Betreuung innerhalb von 24 bis 72 Stunden. Todesfälle sind äußerst selten (DANGERFIELD, 1973; BERGDOLL, 1979, 1983).

Aufgrund ihrer Eiweißnatur sind SE Immunogene und regen im lebenden Organismus die Bildung spezifischer Antikörper an (SURGALLA et al., 1954), wodurch sich verschiedene SE-Typen immunologisch differenzieren lassen. Bisher sind mit Sicherheit fünf sich serologisch unterscheidende SE-Typen identifiziert worden, die entsprechend einer Übereinkunft (CASMAN et al., 1963) nach dem Alphabet bezeichnet werden:

- Typ A - SEA (CASMAN, 1960)
- Typ B - SEB (BERGDOLL et al., 1959b)
- Typ C - SEC (BERGDOLL et al., 1965)
- Typ D - SED (CASMAN et al., 1967)
- Typ E - SEE (BERGDOLL et al., 1971)

SEC wurde später in die drei Varianten SEC<sub>1</sub> (BORJA und BERGDOLL, 1967), SEC<sub>2</sub> (AVENA und BERGDOLL, 1967) und SEC<sub>3</sub> (BERGDOLL et al., 1979)

unterteilt, die in ihren antigenen Determinanten nicht vollständig übereinstimmen (BERGDOLL und ROBBINS, 1973; LEE et al., 1980; REISER et al., 1984).

Nach zahlreichen Untersuchungen, zuletzt von LEE et al. (1978; 1980) und THOMPSON et al. (1984), gilt eine serologische Verwandtschaft zwischen SEA und SEE einerseits bzw. SEB und SEC<sub>1</sub> andererseits als erwiesen. Nach Angaben von BERGDOLL (1983) ist darüber hinaus davon auszugehen, daß auch eine Beziehung zwischen SEA, SEE und SED besteht. MEYER et al. (1984) sprechen von einer serologischen Verwandtschaft aller bisher identifizierten SE-Typen, da sie nach Applikation von SEA und SED einen monoklonalen Antikörper erhielten, der die höchste Affinität zu SEB und SEC<sub>1</sub> aufwies und des weiteren mit SEA, SED und SEE reagierte. Ihr Antikörper ist aber von anderer Seite auf seine Eignung zum Nachweis dieser SE offensichtlich noch nicht geprüft worden.

Staphylococcus aureus-Stämme, die von am "Toxic-Shock-Syndrome" erkrankten Patienten isoliert wurden, produzieren eine biologisch aktive Substanz, die aufgrund ihrer emetischen Wirkung von BERGDOLL et al. (1981) zunächst als Staphylokokken-Enterotoxin F (SEF) bezeichnet worden war. In nachfolgenden Untersuchungen konnte die emetische Aktivität dieser Substanz jedoch nicht bestätigt werden (REISER et al., 1983; IGARASHI et al., 1984), so daß aufgrund einer internationalen Übereinkunft die Bezeichnung "Toxic Shock Syndrome Toxin One -TSST-1" eingeführt wurde (BERGDOLL und SCHLIEVERT, 1984). Es ist aber davon auszugehen, daß noch nicht serologisch identifizierte SE-Typen existieren, denn im Affenfütterungstest wurden einige positive Staphylococcus aureus-Stämme gefunden, die nicht mit den bisher bekannten spezifischen Antienterotoxinen nachgewiesen werden konnten (BERGDOLL und ROBBINS, 1973). Eine von BERGDOLL (1983) durchgeführte Analyse von an Lebensmittelvergiftungen beteiligten Staphylokokkenstämmen ergab jedoch, daß noch nicht identifizierte Enterotoxine nur ca. 5 % der Ausbrüche von Staphylokokken-Intoxikationen verursachen.

SE sind einfache, niedermolekulare Proteine, die hygroskopisch sind und sich leicht in Wasser und Salzlösungen lösen lassen (BERGDOLL, 1979). Einige der physikalischen und chemischen Eigenschaften der SE sind in Tabelle 1 wiedergegeben.

Tab. 1: Einige chemische und physikalische Eigenschaften der verschiedenen SE-Typen

| Eigenschaft                                           | SEA <sup>1)</sup> | SEB <sup>2)</sup>    | SEC <sub>1</sub> <sup>3)</sup> | SEC <sub>2</sub> <sup>4)</sup> | SEC <sub>3</sub> <sup>5)</sup> | SED <sup>6)</sup> | SEE <sup>7)</sup> |
|-------------------------------------------------------|-------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|-------------------|-------------------|
| Emetische Dosis<br>(ED <sub>50</sub> ) (µg/Affe)      | 5                 | 5                    | 5                              | 5-10                           | < 10                           | 20                | 10                |
| Molekulargewicht                                      | 27.800            | 28.366 <sup>8)</sup> | 27.500 <sup>9)</sup>           | 26.000 <sup>1)</sup>           | 27.111                         | 27.300            | 29.600            |
| Isoelektrischer<br>Punkt                              | 7,3               | 8,6                  | 8,6                            | 7,0                            | 8,15                           | 7,4               | 7,0               |
| Absorptionsmaxi-<br>mum (nm)                          | 277               | 277                  | 277                            | 277                            | 277 <sup>10)</sup>             | 278               | 277               |
| Extinktion<br>(E <sub>1%</sub> <sup>1)</sup><br>1 cm) | 14,6              | 14,4                 | 12,1                           | 12,1                           | 12,1 <sup>10)</sup>            | 10,8              | 12,5              |

1) SCHANTZ et al. (1972)

6) CHANG und BERGDOLL (1979)

2) BERGDOLL et al. (1965)

7) BORJA et al. (1972)

3) BORJA und BERGDOLL (1967)

8) HUANG und BERGDOLL (1970)

4) AVENA und BERGDOLL (1967)

9) SCHMIDT und SPERO (1983)

5) REISER et al. (1984)

10) REISER und BERGDOLL (1979)

## 2.1.2 Spezielle Eigenschaften

Da in die eigenen Untersuchungen zur Reinigung von SE nur SED einbezogen wurde, beschränken sich die folgenden Angaben auf diesen Typ. SED wurde erstmals von CHANG und BERGDOLL (1979) rein dargestellt, und diesen Autoren sind auch die meisten Erkenntnisse über die Eigenschaften von SED zu verdanken: SED besteht aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich aus 236 Aminosäuren zusammensetzt (Tab. 2). Ebenso wie bei den anderen SE dominieren unter den im SED vorkommenden Aminosäuren Asparaginsäure, Glutaminsäure und Lysin, während Tryptophan und Cystein nur einen sehr geringen Anteil haben. SED besitzt zwei Methioninreste und gleicht in diesem Punkt SEA und SEE, wohingegen es sich von SEB und SEC mit acht oder neun Methioninresten deutlich unterscheidet. Der Tyrosingehalt im SED ist niedriger als bei allen anderen SE, was möglicherweise zu seiner geringeren Toxizität (Tab. 1) beiträgt. Als endständige Aminosäuren wurden am N-Terminal Serin und am C-Terminal Lysin identifiziert. Freie Sulfhydrylgruppen konnten im gereinigten SED nicht nachgewiesen werden.

SED besteht ebenso wie die anderen SE aus mehreren Komponenten mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI). Dieses Phänomen wird als Mikroheterogenität bezeichnet und ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß aus basischen SE-Komponenten aufgrund der Hydrolyse labiler Amidgruppen saure Komponenten entstehen (CHANG und DICKIE, 1971; SPERO et al., 1974; METZGER et al., 1975). Bei dem in Tabelle 1 für SED aufgeführten pI von 7,4 handelt es sich um den Wert, den CHANG und BERGDOLL (1979) mittels isoelektrischer Fokussierung (IEF) für die Hauptkomponente des Toxins ermittelt haben. NOTERMANS et al. (1983) stellten mittels IEF für die Hauptkomponente von SED hingegen einen pI von 7,6 fest, und MÜLLER (1981) fand zwei Hauptkomponenten, deren pI bei 7,2 und 7,45 lag. ODA (1980) löste SED durch IEF in sieben Komponenten mit pI-Werten zwischen 7,9 und 9,3 auf, wobei Hauptkomponente die alkalischste Komponente war. JANIN et al. (1984) schließlich erhielten bei der Chromatofokussierung von SED drei Komponenten mit pI-Werten von 8,6, 8,3 und 8,0.

SED wird schneller denaturiert als die anderen SE-Typen (BERGDOLL, 1979; RICHTER und KARSCH, 1980), ist aber gegenüber chemischen und physikalischen Ein-

Tabelle 2: Aminosäure-Zusammensetzung von SED (nach CHANG und BERGDOLL, 1979)

| Aminosäure     | $\mu\text{mol/mg}$<br>Protein | Anzahl der<br>Reste *) |
|----------------|-------------------------------|------------------------|
| Lysin          | 1,028                         | 28                     |
| Histidin       | 0,198                         | 5                      |
| Arginin        | 0,221                         | 6                      |
| Asparaginsäure | 1,476                         | 40                     |
| Threonin       | 0,455                         | 12                     |
| Serin          | 0,596                         | 16                     |
| Glutaminsäure  | 1,038                         | 28                     |
| Prolin         | 0,148                         | 4                      |
| Glycin         | 0,481                         | 13                     |
| Alanin         | 0,287                         | 8                      |
| Halb-Cystin    | 0,078                         | 2                      |
| Valin          | 0,425                         | 12                     |
| Methionin      | 0,078                         | 2                      |
| Isoleucin      | 0,544                         | 15                     |
| Leucin         | 0,833                         | 23                     |
| Tyrosin        | 0,451                         | 12                     |
| Phenylalanin   | 0,329                         | 9                      |
| Tryptophan     | 0,034                         | 1                      |
| Summe          |                               | 236                    |

\*) berechnet auf der Basis eines Molekulargewichts von 27.300

Tab. 3: Inaktivierung von SED nach Erhitzung

| SED<br>(µg/ml) | Erhitzungs-<br>medium | Einwirkungs-         |                | serologische<br>Restaktivi-<br>tät (%) | Autor(en)                    |
|----------------|-----------------------|----------------------|----------------|----------------------------------------|------------------------------|
|                |                       | tempera-<br>tur (°C) | dauer<br>(min) |                                        |                              |
| 5              | Puffer                | 70                   | 7,5            | 3                                      | SOO et al. (1973)            |
| 0,5            | "                     | 70                   | 7,5            | 8                                      | "                            |
| 5              | "                     | 90                   | 7,5            | 6                                      | "                            |
| 0,5            | "                     | 90                   | 7,5            | 24                                     | "                            |
| 1              | Vollmilch             | 72                   | 0,25           | 30                                     | TATINI (1976)                |
| 1              | Magermilch            | 72                   | 0,25           | 30                                     | "                            |
| 1              | Sahne                 | 72                   | 0,25           | 15                                     | "                            |
| 0,05           | Vollmilch             | 143,3                | 0,15           | 10                                     | "                            |
| 0,005          | Vollmilch             | 143,3                | 0,15           | 16                                     | "                            |
| ?              | ?                     | 90                   | 60             | 35                                     | CHANG u.BERG-<br>DOLL (1979) |
| ?              | ?                     | 90                   | 120            | 15                                     | "                            |
| ?              | ?                     | 100                  | 60             | 15                                     | "                            |
| ?              | ?                     | 100                  | 120            | 5                                      | "                            |

flüssen noch recht widerstandsfähig. So wird SED in nativem Zustand durch die proteolytische Aktivität von Trypsin nicht beeinträchtigt und ist im pH-Bereich von 1,2 bis 10,7 stabil. Eine Denaturierung von SED tritt erst ab pH 11,2 ein, und zu einem vollständigen Verlust seiner serologischen Aktivität kommt es nach dreistündiger Inkubation bei pH 12,8 (CHANG und BERGDOLL, 1979).

Temperaturen von über 60° C bedingen eine Inaktivierung von SED (YAMADA, 1977b), deren Grad, außer von der Einwirkungstemperatur und -dauer, von der Art des Erhitzungsmediums und der Toxinkonzentration beeinflusst wird (Tab. 3). Auch das pH des Erhitzungsmediums spielt dabei eine Rolle: im pH-Bereich von 4,5 bis 5,5 zeigt SED sich widerstandsfähiger gegen Hitzeeinwirkung als bei pH-Werten oberhalb von 6,0 (TATINI, 1976). Von praktischer Bedeutung ist, daß Temperaturen von 60 und 70° C zu einer schnelleren Inaktivierung von SED führen als Temperaturen von 80 und 90° C (SOO et al., 1973; YAMADA, 1977b). YAMADA (1977b) erklärt dieses Phänomen mit einer reversiblen Aggregation der Toxinmoleküle bei der niedrigeren Erhitzungstemperatur. Die Behandlung von hitzeinaktiviertem SED mit Harnstoff ermöglicht eine Reaktivierung, deren Ursache in einer Rückfaltung nicht vollständig denaturierter Toxinmoleküle vermutet wird (TATINI, 1976).

## **2.2    Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken-Enterotoxin D (SED) und ihre Epidemiologie**

### **2.2.1    Beteiligung von SED an Lebensmittelvergiftungen**

Auch wenn bei Staph.-Lebensmittelvergiftungen alle serologisch identifizierten SE-Typen als auslösendes Agens beschrieben wurden, so bestehen doch deutliche Unterschiede in der Häufigkeit der einzelnen Typen. In Tab. 4 sind Ergebnisse der Enterotoxintestung an im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen isolierten Staph. zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß Stämme, die SEA allein oder in Kombination mit anderen SE-Typen bilden, dominieren und SED am zweithäufigsten auftritt. Einen weiteren Anhaltspunkt über die Beteiligung von SED an Staph.-Intoxikationen geben Statistiken des Center for Disease Control. Von den im Zeitraum von 1969 bis 1971 und von 1977 bis 1981 in USA gemeldeten Ausbrüchen von Staph.-Intoxikationen konnte bei 47 der verantwortliche SE-Typ bzw. die Typkombination identifiziert werden.

Tab. 4: Enterotoxinbildner unter im Zusammenhang mit Lebensmittelvergiftungen isolierten Staphylokokken

| geprüfte<br>Stämme(n) | geprüfte<br>SE-Typen                  | Anteil SE-po-<br>sitiver Stämme |    | Häufigkeit der SE-Typen<br>(Zahl der Stämme) |                 |                 |                 |                 |    |                 |    |    |                 |    |                                     | Autor(en) |
|-----------------------|---------------------------------------|---------------------------------|----|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|-----------------|----|----|-----------------|----|-------------------------------------|-----------|
|                       |                                       | n                               | %  | I                                            |                 |                 |                 |                 | II |                 |    |    |                 |    |                                     |           |
|                       |                                       |                                 |    | A                                            | B               | C               | D               | E               | A  | B               | C  | D  | E               |    |                                     |           |
| 80                    | A,B,C,D                               | 77                              | 96 | 39                                           | 3               | 2               | 6               | -               |    | 23              | 5  | 4  | 24              | -  | CASMAN et al. (1967)                |           |
| 36                    | A,B,C,D <sup>1)</sup>                 | 33                              | 92 | 25                                           | 0               | 2               | 3               | -               |    | 1               | 1  | 2  | 2               | -  | SIMKOVICOVA u. GILBERT (1971)       |           |
| 8                     | A,B,C,D                               | 6                               | 75 | 1                                            | 0               | 1               | 4               | -               |    | 0               | 0  | 0  | 0               | -  | JARVIS u. HARDING (1972)            |           |
| 34                    | A,B,C,D                               | 33                              | 97 | 8                                            | 1               | 7               | 3               | -               |    | 14              | 0  | 0  | 14              | -  | TERAYAMA et al. (1972)              |           |
| 133                   | A,B,C,D                               | 53                              | 40 | 8                                            | 4               | 3               | 13              | -               |    | 16              | 1  | 11 | 22              | -  | TOSHACH u. THORSTEINSON (1972)      |           |
| 120                   | A,B,C,D,E                             | 113                             | 94 | 53                                           | 0               | 4               | 8               | 2               |    | 35              | 2  | 14 | 40              | 1  | GILBERT (1974)                      |           |
| 103                   | A,B,C,D,E                             | 89                              | 86 | 39                                           | 6               | 16              | 9               | 0               |    | 25              | 0  | 14 | 13              | 1  | YAMADA (1977b)                      |           |
| 61                    | A,B,C,D,E                             | 49                              | 80 | 14                                           | 0               | 3               | 5               | 0               |    | 20              | 1  | 21 | 19              | 0  | NISKANEN u. KOIRANEN (1977)         |           |
| 77                    | A,B,C,D,E                             | 53                              | 69 | 20                                           | 3               | 6               | 7               | 2               |    | 15              | 1  | 4  | 14              | 0  | WINDYGA (1978)                      |           |
| 27                    | A,B,C,D <sup>1)</sup> E <sup>1)</sup> | 25                              | 93 | 20                                           | 0               | 1               | 2               | 0               |    | 2 <sup>2)</sup> |    |    | 2 <sup>2)</sup> | -  | UTERMANN (1980)                     |           |
| 34                    | A,B,C,D,E                             | 23                              | 68 | 8                                            | 0               | 5               | 0               | 3               |    | 7               | 0  | 0  | 0               | 7  | SOUREK (1980)                       |           |
| 24                    | A,B,C,D,E                             | 22                              | 92 | 3                                            | 0               | 5               | 2               | 0               |    | 1               | 4  | 10 | 6               | 4  | RAJALAKSHMI u. RAJYA-LAKSHMI (1982) |           |
| 16                    | A,B,C,D,E                             | 11                              | 69 | 6 <sup>3)</sup>                              | 0 <sup>3)</sup> | 0 <sup>3)</sup> | 3 <sup>3)</sup> | 0 <sup>3)</sup> |    |                 |    |    |                 |    | NOTERMANS et al. (1983)             |           |
| 4                     | A,B,C,D,E                             | 1                               | 25 | 1                                            | 0               | 0               | 0               | 0               |    | 0               | 0  | 0  | 0               | 0  | MAUFF et al. (1983)                 |           |
| 757                   |                                       | 588                             | 78 | 245                                          | 17              | 55              | 65              | 7               |    | 159             | 15 | 80 | 156             | 13 | insgesamt                           |           |

Zeichenerklärung: I: nur ein SE-Typ festgestellt

II: ein SE-Typ in Kombination mit anderen

SE-Typen festgestellt

1): nicht alle Stämme geprüft

2): Kombination mit den SE-Typen A u./o. D

3): SEA, SEB, SEC, SED und SEE allein oder in Kombination mit anderen SE-Typen

Auch hier war SED hinter SEA am zweithäufigsten vertreten. Während SEA an 43 Vergiftungsfällen beteiligt war, rief SED sechs Ausbrüche hervor - fünf davon in Kombination mit SEA (MERSON, 1973; HOLMBERG und BLAKE, 1984).

### 2.2.2 Kontaminationsquellen

Staphylokokken kommen ubiquitär in der Natur vor mit dem Menschen als einem primären Reservoir (MINOR und MARTH, 1976; BERGDOLL, 1979). Etwa 50 % der gesunden Menschen tragen Staph. auf Haut und Schleimhäuten (BERGDOLL, 1979). Außerdem sind Staph. an zahlreichen Krankheitsprozessen beteiligt. Eitrige Wunden, Hautausschläge und dgl. enthalten Staph. in großen Mengen und oft in Reinkultur (MINOR und MARTH, 1976). Wenn solche Veränderungen im Bereich der Hände liegen, besteht eine ausgeprägte Gefahr massiver Kontamination von Lebensmitteln (UNTERMANN, 1980).

Bei der Enterotoxintestung an humanen Staphylokokken hat man regelmäßig einen erheblichen Anteil enterotoxigener Stämme gefunden. So sind unter Staph., die aus Nasen-, Rachen- und Hautabstrichen gesunder Menschen stammten, zwischen 26 und 95 % enterotoxinbildende Stämme nachgewiesen worden, und bei 44 % der enterotoxigenen Stämme wurde die Bildung von SED beobachtet (Tab. 5). Unter Staph. aus humanem klinischen Material haben die meisten Untersucher einen Anteil enterotoxigener Stämme zwischen 30 und 45 % gefunden. Die Bildung von SED wurde hier bei 12 % der enterotoxigenen Stämme nachgewiesen (Tab. 6). Bei den Angaben zum Anteil der SED-Bildner an den enterotoxigenen Staph. ist zu berücksichtigen, daß in Einzeluntersuchungen zum Teil sehr unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen der SE-Typen ermittelt wurden. Dies könnte dadurch bedingt sein, daß die Ergebnisse an Stämmen verschiedener geographischer Herkunft erzielt worden sind (PALASUNTHERAM und BEAUCHAMP, 1982).

Neben den Menschen sind Tiere ein weiteres Staphylokokkenreservoir. Auch bei ihnen besiedeln Staph. Haut und Schleimhäute und sind - in zunehmendem Maße - an Entzündungsprozessen beteiligt (MINOR und MARTH, 1976; BERGDOLL, 1979; UNTERMANN, 1980; DANIELSSON und HELLBERG, 1984).

Tab. 5: Häufigkeit von Enterotoxinbildnern unter aus Nasen-, Rachen- und Hautabstrichen gesunder Menschen isolierten Staphylokokken

| geprüfte<br>Stämme(n) | geprüfte<br>SE-Typen | Anteil SE-po-<br>sitiver Stämme |    | Häufigkeit der SE-Typen<br>(Zahl der Stämme) |                 |                 |                 |                 |                 |    |     |     |   | A u t o r ( e n )       |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------|----|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|-----|-----|---|-------------------------|
|                       |                      | n                               | %  | I                                            |                 |                 |                 |                 | II              |    |     |     |   |                         |
|                       |                      |                                 |    | A                                            | B               | C               | D               | E               | A               | B  | C   | D   | E |                         |
| 144                   | A,B,C,D              | 45                              | 31 | 11                                           | 2               | 4               | 11              | -               | 16              | 4  | 2   | 13  | - | CASMAN et al. (1967)    |
| 200                   | A,B,C,D              | 190                             | 95 | 11                                           | 6               | 12              | 47              | -               | 54              | 18 | 78  | 104 | - | TERAYAMA et al.(1972)   |
| 195                   | A,B,C,D,E            | 134                             | 69 | 20                                           | 12              | 48              | 7               | 0               | 34              | 10 | 37  | 23  | 0 | YAMADA (1977b)          |
| 190                   | A,B,C,D,E            | 50                              | 26 | 17                                           | 8               | 13              | 9               | 0               | 3               | 1  | 0   | 2   | 0 | SOUREK (1980)           |
| 70                    | A,B,C,D,E            | 28                              | 40 | 5                                            | 8               | 11              | 1               | 0               | 3 <sup>1)</sup> |    |     |     |   | MOCHMANN et al. (1981)  |
| 43                    | A,B,C,D,E            | 18                              | 42 | 12                                           | 3               | 2               | 0               | 0               | 1 <sup>1)</sup> |    |     |     |   | RICHTER et al. (1981)   |
| 71                    | A,B,C,D,E            | 46                              | 65 | 19 <sup>2)</sup>                             | 6 <sup>2)</sup> | 9 <sup>2)</sup> | 8 <sup>2)</sup> | 0 <sup>2)</sup> |                 |    |     |     |   | NOTERMANS et al. (1983) |
| 913                   |                      | 511                             | 56 | 95                                           | 45              | 99              | 83              | 0               | 111             | 33 | 117 | 142 | 0 | Insgesamt               |

Zeichenerklärung: I: nur ein SE-Typ festgestellt  
II: ein SE-Typ in Kombination mit anderen SE-Typen festgestellt  
1): SEA u./o. SEB, SEC, SED, SEE  
2): SEA, SEB, SEC, SED, SEE allein oder in Kombination mit anderen SE-Typen

Tab. 6: Häufigkeit von Enterotoxinbildnern unter aus klinischem Material von Menschen isolierten Staphylokokken

| geprüfte<br>Stämme(n) | geprüfte<br>SE-Typen | Anteil SE-po-<br>sitiver Stämme |    | Häufigkeit der SE-Typen<br>(Zahl der Stämme) |                 |                 |                 |                 |    |     |     |    |     |    |                                      | Autor(en) |
|-----------------------|----------------------|---------------------------------|----|----------------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----|-----|-----|----|-----|----|--------------------------------------|-----------|
|                       |                      | n                               | %  | I                                            |                 |                 |                 |                 | II |     |     |    |     |    |                                      |           |
|                       |                      |                                 |    | A                                            | B               | C               | D               | E               | A  | B   | C   | D  | E   |    |                                      |           |
| 438                   | A,B,C,D              | 190                             | 43 | 55                                           | 20              | 9               | 37              | -               |    | 58  | 59  | 7  | 19  | -  | CASMAN et al. (1967)                 |           |
| 46                    | A,B,C,D,E            | 36                              | 78 | 1                                            | 1               | 5               | 0               | 0               |    | 21  | 11  | 19 | 13  | 16 | MÜLLER et al. (1973)                 |           |
| 199                   | A,B,C,D,E            | 91                              | 45 | 12                                           | 12              | 26              | 6               | 4               |    | 28  | 16  | 6  | 13  | 0  | WIENEKE (1974)                       |           |
| 143                   | A,B,C,D,E            | 17                              | 12 | 3                                            | 4               | 3               | 1               | 5               |    | 1   | 0   | 0  | 1   | 0  | MAYER (1975)                         |           |
| 54                    | A,B,C,D,E            | 39                              | 72 | 12                                           | 3               | 4               | 1               | 1               |    | 17  | 4   | 4  | 13  | 10 | OSVATH-MARTON et al.<br>(1976)       |           |
| 264                   | A,B,C,D              | 79                              | 30 | 45                                           | 14              | 14              | 2               | -               |    | 4   | 3   | 0  | 1   | -  | SOUREK et al. (1979)                 |           |
| 282                   | A,B,C,D,E            | 105                             | 37 | 56                                           | 14              | 15              | 6               | 2               |    | 11  | 10  | 3  | 0   | 0  | SOUREK (1980)                        |           |
| 81                    | A,B,C,D,E            | 36                              | 44 | 3                                            | 16              | 3               | 3               | 0               |    | 1   | 10  | 7  | 5   | 0  | GIRUA u. MITHAL (1980)               |           |
| 3609                  | A,B,C,D,E            | 1953                            | 54 | 1150                                         | 158             | 311             | 128             | 4               |    | 188 | 98  | 12 | 95  | 12 | PETRAS u. MASKOVA (1980)             |           |
| 271                   | A,B,C,D,E            | 84                              | 31 | 39                                           | 9               | 3               | 18              | 2               |    | 132 |     |    |     |    | MOCHMANN et al. (1981)               |           |
| 1154                  | A,B,C,D,E            | 768                             | 67 | 500                                          | 69              | 127             | 17              | 0               |    | 54  | 41  | 0  | 13  | 2  | RASKA et al. (1981)                  |           |
| 267                   | A,B,C,D,E            | 120                             | 45 | 37                                           | 27              | 16              | 21              | 0               |    | 192 |     |    |     |    | RICHTER et al. (1981)                |           |
| 157                   | A,B,C,D              | 36                              | 23 | 13                                           | 12              | 3               | 7               | -               |    | 0   | 1   | 0  | 1   | -  | BERMAN et al. (1981)                 |           |
| 293                   | A,B,C,D,E            | 115                             | 39 | 14                                           | 50              | 20              | 20              | 2               |    | 9   | 2   | 1  | 0   | 6  | PALASUNTHARAM u.<br>BEAUCHAMP (1982) |           |
| 664                   | A,B,C,D,E            | 285                             | 43 | 199                                          | 8               | 23              | 13              | 3               |    | 38  | 33  | 1  | 6   | 0  | PETRAS u. MASKOVA (1982)             |           |
| 50                    | A,B,C,D,E            | ?                               | ?  | 7 <sup>1)</sup>                              | 8 <sup>1)</sup> | 3 <sup>1)</sup> | 3 <sup>1)</sup> | 0 <sup>1)</sup> |    |     |     |    |     |    | DE NOOIJ et al. (1982)               |           |
| 208                   | A,B,C,D,E            | 88                              | 42 | 29                                           | 20              | 15              | 4               | 0               |    | 16  | 8   | 5  | 10  | 1  | MAUFF et al. (1983)                  |           |
| 8180                  |                      | 4042                            | 49 | 2175                                         | 445             | 600             | 287             | 23              |    | 478 | 296 | 65 | 190 | 47 | Insgesamt                            |           |

Zeichenerklärung: I: nur ein SE-Typ festgestellt  
 II: ein SE-Typ in Kombination mit anderen  
 SE-Typen festgestellt  
 1): SEA, SEB, SEC, SED, SEE allein oder in Kombination mit anderen SE-Typen  
 2): SEA u./o. SEB, SEC, SED, SEE

Demzufolge kann die Kontamination eines Lebensmittels auch vom lebensmittelliefernden Tier her erfolgen (SINELL, 1985). Die wichtigste Kontaminationsquelle seitens des Tieres ist das Euter der Kuh (BERGDOLL, 1979). Aufgrund der weiten Verbreitung subklinischer Staph.-Mastitiden werden Staph. regelmäßig in der Rohmilch nachgewiesen (TERPLAN et al., 1971; UNTERMANN et al., 1973; UNTERMANN, 1974). Aber auch Besiedlungen der Haut und des Haarkleides der Tiere sind lebensmittelhygienisch bedeutsam. Aus diesen Quellen stammende Staph. können während der Fleischgewinnung auf das Muskelgewebe übertragen werden (MINOR und MARTH, 1976).

Unter Staph. von lebensmittelliefernden Tieren ist SED-Synthese in erwähnenswertem Umfang nur bei den enterotoxigenen Rinder- und Geflügelstämmen beobachtet worden. Allerdings sind aus dem Material dieser Tiere isolierte Staph. i.d.R. sehr viel seltener Enterotoxinbildner als aus humanem Material gezüchtete (Tab. 7 und 8).

Auch wenn sowohl beim Mensch als auch beim Tier SED-bildende Staph. vorkommen, so sind diese doch hinsichtlich ihrer lebensmittelhygienischen Bedeutung unterschiedlich zu bewerten. Als Ursache für Lebensmittelintoxikationen werden im allgemeinen erhitzte und nachträglich mit enterotoxigenen Staph. kontaminierte Lebensmittel festgestellt. Dabei spielt die mangelnde Fähigkeit der Staph., sich gegen eine konkurrierende Mikroflora durchzusetzen, eine Rolle. In rohen Lebensmitteln kann wegen der stets vorhandenen Begleitflora die für eine Intoxikation erforderliche Vermehrung enterotoxinbildender Staph. nur beim Zusammentreffen mehrerer ungewöhnlicher Umstände erfolgen. Hingegen wird die Vermehrung in erhitzten und dann - zumeist in Reinkultur - rekontaminierten Produkten nicht oder nur unwesentlich gehemmt (Literaturangaben bei MINOR und MARTH, 1976; SMITH et al., 1983). Als Kontaminationsquelle für erhitzte Lebensmittel kommt jedoch praktisch nur der Mensch in Betracht. Vom Tier stammende Staph. sind es dann, wenn Gerätschaften oder der Mensch als Zwischenträger fungieren (UNTERMANN, 1972). Es wurde allerdings beobachtet, daß Menschen, die berufsbedingt häufig mit Tieren oder vom Tier stammenden Lebensmitteln in Berührung kommen, auch häufig Träger tierischer Staphylokokkenstämme (Biotyp B-F nach HAJEK und MARSALEK, 1973) sind (FRANCISCO-POLLEDO et al., 1983).

Tab. 7: Häufigkeit von Enterotoxinbildnern unter aus Rohmilch u./o. Mastritissekret des Rindes isolierten Staphylokokken

| geprüfte<br>Stämme (n) | geprüfte<br>SE-Typen | Anteil SE-po-<br>sitiver Stämme<br>n % | Häufigkeit der SE-Typen<br>(Zahl der Stämme) |     |    |     |     |    |                 |    |    |    | Autor(en) |                                 |
|------------------------|----------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|-----|----|-----|-----|----|-----------------|----|----|----|-----------|---------------------------------|
|                        |                      |                                        | I                                            |     |    |     |     | II |                 |    |    |    |           |                                 |
|                        |                      |                                        | A                                            | B   | C  | D   | E   | A  | B               | C  | D  | E  |           |                                 |
| 287                    | A,B,C,D              | 25                                     | 9                                            | 2   | 2  | 1   | 15  | -  | 2               | 0  | 2  | 2  | -         | CASMAN et al. (1967)            |
| 51                     | A,B,C,D              | 2                                      | 4                                            | 1   | 1  | 0   | 0   | -  | 0               | 0  | 0  | 0  | -         | UTERMANN und SI-<br>NELL (1970) |
| 157                    | A,B,C,D              | 23                                     | 15                                           | 0   | 0  | 11  | 11  | -  | 0               | 0  | 1  | 1  | -         | OLSON et al. (1970)             |
| 136                    | A,B,C,D              | 13                                     | 10                                           | 3   | 2  | 1   | 5   | -  | 2               | 2  | 0  | 0  | -         | TERPLAN et al. (1971)           |
| 50                     | A,B,C,D,E            | 3                                      | 6                                            | 0   | 0  | 0   | 3   | 0  | 0               | 0  | 0  | 0  | 0         | WIENEKE (1974)                  |
| 297                    | A,B,C,D,E            | 45                                     | 15                                           | 11  | 10 | 4   | 15  | 1  | 3               | 1  | 0  | 4  | 0         | MAYER (1975)                    |
| 174                    | A,B,C,D,E            | 72                                     | 41                                           | 25  | 4  | 17  | 14  | 0  | 10              | 0  | 4  | 10 | 0         | NISKANEN und<br>KOIRANEN (1977) |
| 57                     | A,B,C,D,E            | 4                                      | 7                                            | 0   | 0  | 3   | 1   | 0  | 0               | 0  | 0  | 0  | 0         | GARCIA et al. (1980)            |
| 101                    | A,B,C,D,E            | 11                                     | 11                                           | 2   | 0  | 6   | 3   | 0  | 0               | 0  | 0  | 0  | 0         | LOMBAI et al. (1980)            |
| 1056                   | A,B,C,D,E            | 363                                    | 34                                           | 46  | 34 | 155 | 55  | 0  | 67              | 5  | 42 | 43 | 0         | KATO und KUME (1980)            |
| 258                    | A,B,C,D,E            | 22                                     | 9                                            | 7   | 0  | 2   | 5   | 3  | 5 <sup>1)</sup> |    |    |    |           | RICHTER et al. (1981)           |
| 285                    | A,B,C,D              | 48                                     | 17                                           | 5   | 15 | 15  | 4   | -  | 4               | 8  | 4  | 3  | -         | BRÜCKLER et al. (1981)          |
| 24                     | A,B,C,D,E            | 1                                      | 4                                            | 0   | 0  | 1   | 0   | 0  | 0               | 0  | 0  | 0  | 0         | DE NOOIJ et al. (1982)          |
| 24                     | A,B,C,D,E            | 2                                      | 8                                            | 0   | 0  | 0   | 2   | 0  | 0               | 0  | 0  | 0  | 0         | HILL (1983)                     |
| 2957                   |                      | 634                                    | 21                                           | 102 | 68 | 216 | 133 | 4  | 93              | 16 | 53 | 63 | 0         | Insgesamt                       |

Zeichenerklärung:

- I: nur ein SE-Typ  
 II: ein SE-Typ in Kombination mit anderen SE-Typen  
 1): SEA u./o. SEB, SEC, SED, SEE

Tab. 8: Häufigkeit von Enterotoxinbildnern unter von Geflügel bzw. aus dessen Umgebung (Eier, Stall etc.) isolierten Staphylokokken

| geprüfte<br>Stämme(n) | geprüfte<br>SE-Typen                                          | Anteil SE-po-<br>sitiver Stämme |    | Häufigkeit der SE-Typen<br>(Zahl der Stämme) |   |   |     |   |    |   |   |    |   |                             |  | Autor(en) |
|-----------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------|----|----------------------------------------------|---|---|-----|---|----|---|---|----|---|-----------------------------|--|-----------|
|                       |                                                               | n                               | %  | I                                            |   |   |     |   | II |   |   |    |   |                             |  |           |
|                       |                                                               |                                 |    | A                                            | B | C | D   | E | A  | B | C | D  | E |                             |  |           |
| 586                   | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 16                              | 3  | 1                                            | 0 | 7 | 6   | 0 | 1  | 1 | 2 | 0  | 0 | SHIOZAWA et al. (1980)      |  |           |
| 116                   | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 3                               | 3  | 0                                            | 0 | 0 | 3   | 0 | 0  | 0 | 0 | 0  | 0 | RICHTER et al. (1981)       |  |           |
| 310                   | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 203                             | 66 | 38                                           | 0 | 0 | 153 | 0 | 12 | 0 | 0 | 12 | 0 | RASKA et al. (1981)         |  |           |
| 139                   | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 35                              | 25 | 2                                            | 0 | 0 | 32  | 0 | 0  | 0 | 1 | 1  | 0 | HARVEY et al. (1982)        |  |           |
| 500                   | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 141                             | 28 | 6                                            | 5 | 0 | 130 | 0 | 0  | 0 | 0 | 0  | 0 | PETRAS u. MASKOVA<br>(1982) |  |           |
| 14                    | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 2                               | 14 | 1                                            | 0 | 0 | 1   | 0 | 0  | 0 | 0 | 0  | 0 | DE NOOIJ et al. (1982)      |  |           |
| 20                    | A <sub>1</sub> B <sub>1</sub> C <sub>1</sub> D <sub>1</sub> E | 3                               | 15 | 0                                            | 0 | 1 | 2   | 0 | 0  | 0 | 0 | 0  | 0 | EVANS et al. (1983)         |  |           |
| 1685                  |                                                               | 403                             | 24 | 48                                           | 5 | 8 | 327 | 0 | 13 | 1 | 3 | 13 | 0 | Insgesamt                   |  |           |

Zeichenerklärung:

I: nur ein SE-Typ festgestellt

II: ein SE-Typ in Kombination mit anderen SE-Typen festgestellt

## 2.3 Reinigung von SE

### 2.3.1 Produktion von SE für Reinigungsversuche

SE, insbesondere die SE-Typen A, D und E, werden von *S. aureus* in relativ geringen Mengen synthetisiert (BERGDOLL, 1967; 1979) (s. auch Tab. 9). Um ausreichend SE für Reinigungsversuche zu bilden, müssen daher *S. aureus*-Stämme möglichst hoher Enterotoxigenität eingesetzt werden. Da *S. aureus* neben den SE aber noch eine Reihe anderer Exoproteine synthetisiert, deren Zahl in Abhängigkeit vom Produktionsstamm qualitativ und quantitativ schwankt (WADSTRÖM et al., 1974), ist bei der Auswahl zur SE-Produktion geeigneter Staph.-Stämme nicht nur das Enterotoxinbildungsvermögen entscheidend, sondern auch die Stoffwechselaktivität. Dies gilt insbesondere im Hinblick auf Metaboliten, die aufgrund ihrer chemisch-physikalischen Eigenschaften bei der SE-Reinigung interferieren können. So hat man z.B. SEA - mit Ausnahme von NOTERMANS et al. (1983) - nicht mehr mit den *S. aureus*-Stämmen 196 E und 246-3 produziert, nachdem man festgestellt hatte, daß diese Stämme neben SEA Proteine synthetisieren, die nur schwer von dem Enterotoxin abzutrennen sind (CHU et al., 1966; KATO et al., 1966). Bei der Produktion von SED scheint es jedoch keine Rolle zu spielen, welcher Stamm eingesetzt wird. SED-Bildner unterscheiden sich in ihrem SED-Bildungsvermögen offenbar nicht wesentlich voneinander und bilden alle das nur schwer von SE abzutrennende  $\beta$ -Hämolysin sowie ein weiteres bei der Reinigung interferierendes Protein, das gegen proteolytischen Abbau resistent ist (BERGDOLL, 1972; 1979). Durch Auswahl einzelner Kolonien von SE-bildenden Staph.-Stämmen können nach BERGDOLL et al. (1961) aber Kulturen gewonnen werden, die geringere Mengen die SE-Reinigung störender Exoproteine bilden.

Die Produktion der nachfolgend einer Reinigung zu unterziehenden SE erfolgte meist in flüssigen Nährmedien (mit Schüttel-, Fermenter- oder statischen Kulturen) (Tab. 9), mit denen sich bei Einsatz großer Nährbodenvolumina größere SE-Mengen pro Ansatz gewinnen lassen (BERGDOLL, 1979). Um die Reinigung nicht unnötig zu erschweren, hat man dabei ausschließlich Nährmedien aus niedermolekularen Bestandteilen verwendet, die leicht von den SE abgetrennt werden können. Vereinzelt wurde das Toxin für die Reinigungsversuche aber auch mit der Zellophanmembran-Agar-Technik (HALLANDER, 1966) und

Tab. 9: Produktion von SE für Reinigungsversuche

| SE-Typ         | S. aureus Stamm | Züchtungsverfahren            | Toxin-<br>ausbeute<br>(µg/ml) | Autor(en)                     |
|----------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| A              | 246-3           | statische, belüftete Kultur   | ?                             | CASMAN und BENNETT (1964)     |
|                | 100             | Schüttelkultur                | 1-5                           | CHU et al. (1966)             |
|                | 196 E           | Schüttelkultur                | ?                             | DENNY et al. (1966)           |
|                | 100             | Schüttelkultur                | ?                             | TAN et al. (1969)             |
|                | 13 N-2909       | "deep culture"                | 15-25                         | SCHANTZ et al. (1972)         |
|                | 100             | statische Kultur              | ?                             | EZECHUK et al. (1974)         |
|                | 11 N-165        | sac-culture-Technik           | 75-100                        | ROBERN et al. (1975b)         |
|                | 13 N-2909       | Schüttelkultur                | ?                             | YAMADA et al. (1976)          |
|                |                 |                               |                               | YAMADA (1977a)                |
|                | FRI-722         | Schüttelkultur                | 16-32                         | ODA (1978)                    |
|                | FRI-722         | sac-culture-Technik           | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
|                | 722             | ?                             | ?                             | FLUER und RYBASOVA (1981)     |
|                | FRI-722(H)      | Schüttelkultur                | ?                             | EZECHUK et al. (1981)         |
| B              | 196 E           | sac-culture-Technik           | ?                             | NOTERMANS et al. (1983)       |
|                | FRI-722         | Schüttelkultur                | 20-30                         | FEY et al. (1984)             |
|                | 722             | sac-culture-Technik           | ?                             | JANIN et al. (1984)           |
|                | S-6             | statische, belüftete Kultur   | ?                             | BERGDOLL et al. (1959a, 1961) |
|                | S-6             | Schüttelkultur                | ?                             | FREA et al. (1963)            |
|                | S-6             | statische, belüftete Kultur   | 100-200                       | SCHANTZ et al. (1965)         |
|                | S-6             | Zellophanmembran-Agar-Technik | ?                             | HALLANDER (1966)              |
|                | 64-1-T          | Schüttelkultur                | 200-320                       | BOWDEN (1968)                 |
|                | S-6             | Schüttelkultur                | ?                             | CHANG und DICKIE (1971)       |
|                | S-6             | Fermenterkultur               | ?                             | CHANG et al. (1971a)          |
|                | C-243           | ?                             | ?                             | YAMADA (1977a)                |
|                | 243             | Schüttelkultur                | 80-160                        | ODA (1978)                    |
|                | 243             | Schüttelkultur                | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
| C <sub>1</sub> | 10-275          | Schüttelkultur                | 235*)                         | ENDE et al. (1983)            |
|                | S-6             | Schüttelkultur                | 200                           | MELCONIAN et al. (1983)       |
|                | 243             | Schüttelkultur                | ?                             | NOTERMANS et al. (1983)       |
|                | 243             | Schüttelkultur                | 40-50                         | FEY et al. (1984)             |
|                | FRI-137         | Schüttelkultur                | 60                            | BORJA und BERGDOLL (1967)     |
|                | 137-H-2         | Fermenterkultur               | ?                             | METZGER et al. (1975)         |
|                | 137             | Schüttelkultur                | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
|                | 137             | Schüttelkultur                | ?                             | NOTERMANS et al. (1983)       |
|                | 137             | Schüttelkultur                | ?                             | ENDE et al. (1983)            |
|                | 137             | Schüttelkultur                | 30-40                         | FEY et al. (1984)             |
|                | 137             | sac-culture-Technik           | ?                             | JANIN et al. (1984)           |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
| C <sub>2</sub> | FRI-361         | Schüttelkultur                | 60                            | AVENA und BERGDOLL (1967)     |
|                | 361             | Schüttelkultur                | ?                             | CHANG et al. (1971b)          |
|                | 361             | Fermenterkultur               | ?                             | METZGER et al. (1975)         |
|                | 361             | sac-culture-Technik           | 100-150                       | ROBERN et al. (1975a)         |
|                | 361             | sac-culture-Technik           | 75-100                        | ROBERN et al. (1975b)         |
|                | 493             | ?                             | ?                             | YAMADA (1977a)                |
|                | FRI-361         | Schüttelkultur                | 80-160                        | ODA (1978)                    |
|                | FRI-361         | Schüttelkultur                | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
| C <sub>3</sub> | FRI-913         | Schüttelkultur                | ?                             | REISER et al. (1984)          |
|                | FRI-1230        | Schüttelkultur                | ?                             | "                             |
| D              | 494             | statische, belüftete Kultur   | ?                             | CASMAN et al. (1967)          |
|                | 494             | Schüttelkultur                | ?                             | IGARASHI (1972)               |
|                | FRI-419         | Schüttelkultur                | ?                             | LANGNER und KLOSS (1974)      |
|                | 1151            | ?                             | ?                             | YAMADA (1977a)                |
|                | 1151 m          | Fermenterkultur               | 0,5-1                         | KARSCH und BERGDOLL (1979)    |
|                | FRI-472         | sac-culture-Technik           | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
|                | 1151-7NG-3      | Schüttelkultur                | ?                             | ODA (1980)                    |
|                | 1151 m          | Schüttelkultur                | 0,4-0,6                       | MÜLLER (1981)                 |
|                | 1151 m          | sac-culture-Technik           | ?                             | NOTERMANS et al. (1983)       |
|                | 1151 m          | Schüttelkultur                | 0,5-0,8                       | FEY et al. (1984)             |
|                | 1151 m          | sac-culture-Technik           | ?                             | JANIN et al. (1984)           |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
| E              | FRI-326         | Schüttelkultur                | 3-5                           | BORJA et al. (1972)           |
|                | FRI-326         | ?                             | ?                             | TERAYAMA et al. (1972)        |
|                | FRI-326         | Schüttelkultur                | ?                             | SHINAGAWA et al. (1977)       |
|                | FRI-326         | ?                             | ?                             | YAMADA (1977a)                |
|                | FRI-329         | sac-culture-Technik           | ?                             | KARSCH und RICHTER (1979)     |
|                | FRI-326         | Schüttelkultur                | ?                             | BURKHARD (1980)               |
|                | FRI-326         | Schüttelkultur                | 0,5-1                         | ODA (1980)                    |
|                | 326 E           | sac-culture-Technik           | ?                             | NOTERMANS et al. (1983)       |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |
|                |                 |                               |                               |                               |

\*) nach Ende (1985)

von einigen Autoren (ROBERN et al., 1975a; 1975b; KARSCH und RICHTER, 1979; NOTERMANS et al., 1983; JANIN et al., 1984) mit dem "sac-culture"-Verfahren nach DONELLY et al. (1967) produziert. Insbesondere die letztgenannte Technik, bei der ähnlich wie bei der Zellophanmembran-Agar-Technik Medium und Staphylokokken durch eine semipermeable Membran getrennt sind, gestattet die Gewinnung hoher Enterotoxinkonzentrationen (ROBBINS et al., 1974) und ermöglicht damit die Verringerung der bei der Reinigung aufzuarbeitenden Kulturvolumina.

### 2.3.2 Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand

Da die meisten SE nur in sehr geringen Mengen gebildet werden, ist die Gewinnung aus großen Volumina des Kulturüberstandes eines der Hauptprobleme ihrer Reinigung (BERGDOLL, 1970; 1972). Anfänglich sind die SE mit verschiedenen chemischen Agenzien aus dem Kulturüberstand ausgefällt worden (s. Abschnitt 2.3.3). Diese Methode hat sich jedoch nicht bewährt. Statt die SE auszufällen, hat man dann die SE-haltigen Kulturüberstände konzentriert, wobei folgende Konzentrierungsmethoden zum Einsatz gekommen sind:

- Lyophilisation (EZEPCHUK et al., 1974 und 1981; ROBERN et al., 1975b),
- Evaporation (BERGDOLL et al., 1951; HALLANDER, 1966),
- Ultrafiltration (KARSCH und RICHTER, 1979),
- Hohlfaserdialyse (BURKHARD, 1980; MÜLLER, 1981),
- Dialyse gegen Polyethylenglykol (PEG) (FREA et al., 1963; CHU et al., 1966; DENNY et al., 1966; AVENA und BERGDOLL, 1967; BORJA und BERGDOLL, 1967; CASMAN et al., 1967; TAN et al., 1969; CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971b; BORJA et al., 1972; IGARASHI, 1972; LANGNER und KLOSS, 1974; BURKHARD, 1980).

Bei der Lyophilisation, die zur Konzentrierung SEA- und  $SEC_2$ -haltiger Kulturüberstände diente, entstanden für SEA Verluste in Höhe von 20 - 25 % (EZEPCHUK et al., 1981). Die für die Konzentrierung SED- und SEE-haltiger Kulturüberstände verwendete Hohlfaserdialyse war ebenfalls mit hohen Toxinverlusten verbunden (BURKHARD, 1980; MÜLLER, 1981), die für SED mit 33 % beziffert wurden (MÜLLER, 1981). Der größte Teil dieser Verluste war, zumindest im Fall von SED, darauf zurückzuführen, daß sich das Konzentrat nicht

vollständig aus dem Hollow-Fiber-Konzentriersystem entfernen ließ (MÜLLER, 1981). Angaben zur Rückgewinnung von SE nach Konzentrierung der Kulturüberstände durch Dialyse gegen PEG beschränken sich auf SEC<sub>1</sub>, SEC<sub>2</sub> und SEE. So betrug die Ausbeute an SEC<sub>1</sub> und SEC<sub>2</sub> nach der Dialyse gegen PEG jeweils 90 % (AVENA und BERGDOLL, 1967; BORJA und BERGDOLL, 1967) und die an SEE 60 - 70 % (BORJA et al., 1972). Für die anderen Konzentrierungsmethoden wurden hinsichtlich der dabei entstehenden Toxinverluste keine Angaben gemacht. Da all diese Konzentrierungsmethoden eine begrenzte Kapazität besitzen, konnten damit nur vergleichsweise geringe Kulturüberstandsvolumina aufgearbeitet werden (BERGDOLL, 1967, 1970). BERGDOLL et al. (1961) erkannten als erste die Möglichkeit, Enterotoxin durch Adsorption an einen Ionenaustauscher - hier Amberlite CG 50 (früher als Amberlite IRC-50 bezeichnet) - aus dem Kulturüberstand zu gewinnen. Sie erzielten mit dieser Prozedur eine SEB-Präparation, die in ihrer biologischen Aktivität durch Säurefällung, Adsorption an Aluminiumoxid und Alkoholfällung gereinigtem SEB (BERGDOLL et al., 1959a) entsprach, wobei die Wiederfindungsrate aber zweimal so hoch war. Nachdem Bedingungen gefunden wurden, unter denen auch die anderen SE-Typen aus dem Kulturüberstand an Ionenaustauscher gebunden werden können, hat sich diese Methode - nicht zuletzt auch aufgrund ihrer hohen Kapazität - als Eingangsschritt bei der Reinigung heute weitgehend durchgesetzt (ausführliche Angaben hierzu s. Abschnitt 2.3.4.2).

### 2.3.3 Reinigung von SE mittels Fällungsmethoden

Die Fällung mit verschiedenen chemischen Agenzien ist eine klassische Methode zur Reinigung von Proteinen und beruht auf deren unterschiedlichem Löslichkeitsverhalten. Ein Vorteil dieser Methode ist, daß sie große Probenvolumina erlaubt und neben der Reinigung der Proteine auch eine Konzentrierung der Probenlösungen ermöglicht.

Bei der Reinigung von SE haben Fällungen mit Säure, Ammoniumsulfat und Alkohol Verwendung gefunden. Die Säurefällung wurde zur Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand eingesetzt und erfolgte für die Enterotoxine A - C mit Phosphorsäure bei pH 3,5 (BERGDOLL et al., 1959a; BERGDOLL, 1967; 1970), für SEA und SEC daneben auch mit Trichloressigsäure bei pH 2,9 (CASHMAN und BENNETT, 1964; BERGDOLL, 1967). Da jedoch die Toxinausbeuten

bei der Phosphorsäurepräzipitierung insgesamt unbefriedigend waren (BERGDOLL, 1967; 1970) und die Fällung mit Trichloressigsäure eine Denaturierung der SE bewirkte (CHU et al., 1966; BERGDOLL, 1967; 1970), hat sich diese Methode zur Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand nicht durchsetzen können.

EZEPCHUK et al. (1981) schlugen vor, SEA mit Ammoniumsulfat aus dem Kulturüberstand auszufällen. Durch 60%ige Sättigung des Kulturüberstandes mit Ammoniumsulfat soll es ihnen gelungen sein, SEA bei einer Wiederfindungsrate von 75-80 % 120fach anzureichern. Dabei wurden jedoch jeweils nur 1400 ml-Chargen des Kulturüberstandes verarbeitet. Zur Aufarbeitung großer Kulturvolumina ist - wie BERGDOLL et al. (1959a) bereits viel früher festgestellt haben - die Fällung mit Ammoniumsulfat nicht geeignet.

Die Alkoholfällung kam in späteren Stadien der Enterotoxinreinigung zum Einsatz. Die Fällungen wurden dabei meist mit Äthanol (BERGDOLL et al., 1951; 1959a; 1961; FREA et al., 1963; CASMAN und BENNETT, 1964; EZEPCHUK et al., 1974), vereinzelt auch mit Methanol (BERGDOLL et al., 1951) und jeweils bei Temperaturen unter dem Gefrierpunkt durchgeführt. Die Alkoholendkonzentration betrug meist 40 % (BERGDOLL et al., 1951; 1959a; 1961; FREA et al., 1963; CASMAN und BENNETT, 1964), niedrigere Konzentrationen hat man nur gewählt, wenn die Fällung bei fortgeschrittener Reinigung wiederholt wurde (BERGDOLL et al., 1959a; CASMAN und BENNETT, 1964). EZEPCHUK et al. (1974) fällten SEA aus dem lyophilisierten und anschließend gegen A. dest. dialysierten Kulturüberstand allerdings auch mit einer Äthanolendkonzentration von 67 % aus. Mit diesem Schritt soll ein beachtlicher Grad an Reinigung erzielt worden sein, ohne daß Toxinverluste auftraten. Mit Einführung leistungsfähigerer Trenntechniken ist bei der Reinigung von SE jedoch auf die Fällung mit Alkohol verzichtet worden.

### **2.3.4 Reinigung von SE mittels säulenchromatographischer Methoden**

#### **2.3.4.1 Adsorptionschromatographie**

Die Trennung von Stoffgemischen mittels Adsorptionschromatographie beruht auf der Fähigkeit von bestimmten Materialien, sogenannten Adsorbentien, an ihrer Oberfläche Moleküle in Abhängigkeit von deren molekularer Struktur unterschiedlich stark zu binden.

Im Rahmen der klassischen Niederdruckchromatographie wurden Adsorptionen nur von BERGDOLL et al. (1952; 1959a) zur SE-Reinigung eingesetzt. Diese Autoren haben ihre Versuche mit SEB durchgeführt und als Adsorbens zunächst Kieselgel (Hyflo Super Cel) (BERGDOLL et al., 1952) verwendet. Kieselgel wies jedoch nur eine geringe Kapazität für SEB auf (BERGDOLL, 1967), so daß statt dessen dann Aluminiumoxid zum Einsatz kam. An Aluminiumoxid konnten BERGDOLL et al. (1959a) durch Fällungsreaktionen vorgereinigtes SEB ca. 22fach anreichern. Kurze Zeit später haben sie jedoch festgestellt, daß Ionenaustauschchromatographie bei der Reinigung von SEB der Adsorption an Aluminiumoxid überlegen ist (BERGDOLL et al., 1961).

#### **2.3.4.2 Ionenaustauschchromatographie**

Grundprinzip des Ionenaustausches ist die Trennung von in Lösung befindlichen Substanzen nach ihrer Ladung. Diese Trennung erfolgt mit Hilfe von Ionenaustauschern, die aus einem unlöslichen Gerüst (Matrix), das an zugänglichen Stellen kovalent gebundene, positiv (im Fall eines Anionen-Austauschers) oder negativ geladene (im Fall eines Kationen-Austauschers) funktionelle Gruppen trägt, bestehen. Die funktionellen Gruppen eines Austauschers sind mit Gegenionen assoziiert, die gegen andere gleichsinnig geladene Ionen reversibel ausgetauscht werden können. Die Trennung an Ionenaustauschern beruht nun darauf, daß auszutauschende Ionen, die sich in ihrer Ladung unterscheiden, eine unterschiedliche Affinität zu den funktionellen Gruppen eines Ionenaustauschers aufweisen. Die Affinität eines Ions und damit die Bindung an den Ionenaustauscher ist um so stärker, je höher seine Ladung ist. Zu kontrollieren ist diese Affinität durch das pH und/oder die Ionenstärke des Eluenten.

Bei der Reinigung von SE hat man eine Reihe verschiedener Ionenaustauscher verwendet, die sich nach Typ und Stärke in Gruppen einteilen lassen:

##### **1. Kationenaustauscher:**

stark sauer: SP-Sephadex

mäßig sauer: Phospho-Cellulose

schwach sauer: Amberlite CG-50; Biorex 70; CM-Cellulose, CM-Sephadex

2. Anionenaustauscher:

stark basisch: QAE-Sephadex

mäßig basisch: DEAE-Sephadex; DEAE-Cellulose

3. Amphoterer Ionenaustauscher:

Hydroxylapatit

Neben Typ und Stärke unterscheiden sich die bei der Reinigung der SE verwendeten Ionenaustauscher auch in der Art des Trägermaterials: So handelt es sich bei Hydroxylapatit um einen anorganischen Ionenaustauscher, während Amberlite CG-50 und Biorex Acrylharze sind. Cellulose-Austauscher bestehen aus modifizierter Cellulose, Sephadex-Austauscher aus modifizierten Dextranen. Sepharose leitet sich von quervernetzter Agarose ab. Cellulose-, Sephadex- und Sepharose-Austauscher wurden speziell für den Ionenaustausch mit Makromolekülen entwickelt und unterscheiden sich von Ionenaustauscherharzen durch ihre höhere Permeabilität und niedrigere Ladungsdichte. Aufgrund der niedrigeren Ladungsdichte können Verbindungen unter milderen Bedingungen eluiert werden.

Auf das wichtigste Anwendungsgebiet der Ionenaustauschchromatographie bei der Reinigung von SE, die Abtrennung der SE aus dem Kulturüberstand, wurde bereits in Abschnitt 2.3.2 hingewiesen. Für diesen Zweck wurden die Ionenaustauscher Amberlite CG-50, Biorex 70, CM-Cellulose sowie SP-, CM- und QAE-Sephadex verwendet. Um die SE aus dem Kulturüberstand an diese Austauscher zu binden, mußte die Ionenstärke der Kulturüberstände herabgesetzt werden. Dies wurde im allgemeinen durch Verdünnung der Überstände mit A. dest. erreicht, in einem Fall (FEY et al., 1984) aber auch durch Dialyse. Die Adsorption der SE aus den verdünnten bzw. dialysierten Kulturüberständen erfolgte im Batchverfahren, um die zeitaufwendige Säulenpassage der großen Probenvolumina zu umgehen. Die Elution wurde jedoch mit wenigen Ausnahmen (ROBERN et al., 1975a; FEY et al., 1984) in der Säule durchgeführt.

Das schwach saure Acrylharz Amberlite CG-50, von MELCONIAN et al. (1983) unter dem Handelsnamen Biorex 70 verwendet, ist der am häufigsten zur Abtrennung der SE aus dem Kulturüberstand eingesetzte Ionenaustauscher. Die Chromatographie auf diesem Austauscher wurde jeweils mit Phosphatpuffern betrieben, und zur Elution hat man den Phosphatpuffern meist NaCl zugesetzt (Tab. 10). Für SEA haben SCHANTZ et al. (1972) durch die Abtrennung aus

Tab. 10: Abtrennung von SE aus dem Kulturüberstand an Ionenaustauschern

| Ionenaustauscher         | SE-<br>Typ         | Start- (Äquilibrierungs-) / Elutionsbedingungen                                                     | Autor(en)                |
|--------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Amberlite CG-50          | B                  | 0,02 M PB*, pH 6,2 / 0,2 M PB, pH 6,2                                                               | BERGDOLL et al. (1961)   |
|                          | B                  | 0,05 M PB, pH 6,4 / 0,25 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,8                                                 | SCHANTZ et al. (1965)    |
|                          | B                  | 0,05 M PB, pH 6,4 / 0,15 M PB, pH 6,8                                                               | BOWDEN (1968)            |
|                          | A                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | SCHANTZ et al. (1972)    |
|                          | E                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | TERAYAMA et al. (1974)   |
|                          | C <sub>1</sub>     | 0,01 M PB, pH 6,2 / 0,25 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,8                                                 | METZGER et al. (1975)    |
|                          | C <sub>2</sub>     | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | METZGER et al. (1975)    |
|                          | A                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | YAMADA et al. (1976)     |
|                          | A-E                | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | YAMADA (1977a)           |
|                          | D                  | 0,02 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                  | CHANG u. BERGDOLL (1979) |
|                          | E                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | BURKHARD (1980)          |
|                          | A                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | EZECHUK et al. (1981)    |
|                          | A                  | ? / ?                                                                                               | FLUER u. RYBASOVA (1981) |
|                          | D                  | 0,02 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                  | MÜLLER (1981)            |
|                          | B                  | 0,05 M PB, pH 6,4 / 0,25 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,8                                                 | ENDE et al. (1983)       |
| C <sub>1</sub> , D       | B                  | ? / ?                                                                                               | FLUER (1983)             |
|                          | C <sub>1</sub> , D | ? / ?                                                                                               | JANIN et al. (1984)      |
|                          | C <sub>3</sub>     | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | REISER et al. (1984)     |
| Biorex 70                | B                  | 0,05 M PB, pH 6,4 / 0,25 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,8                                                 | MELCONIAN et al. (1983)  |
| CM-Cel-<br>lulose        | E                  | 0,02 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03-0,1 M PB, pH 6,1-7,0                                       | BURKHARD (1980)          |
|                          | C <sub>1</sub>     | 0,01 M PB, pH 5,5 / Stufengradient: 0,02-0,06 M PB, pH 6,0-6,8                                      | ENDE et al. (1983)       |
|                          | A                  | 0,005 M PB, pH 5,6 / 0,5 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | FEY et al. (1984)        |
|                          | B                  | 0,01 M PB, pH 6,2 / 0,2 M PB, pH 7,0                                                                | FEY et al. (1984)        |
|                          | C <sub>1</sub>     | 0,01 M PB, pH 5,5 / 0,1 M PB, pH 6,8                                                                | FEY et al. (1984)        |
|                          | D                  | 0,01 M PB, pH 5,6 / 0,25 M NaCl in 0,5 M PB, pH 6,2                                                 | FEY et al. (1984)        |
| CM-Sepha-<br>dex (C-25)  | A, C               | 0,01 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,01-0,1 M PB, pH 5,7-7,5                                    | SHINAGAWA et al. (1975)  |
|                          | E                  | 0,01 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,01-0,1 M PB, pH 5,7-7,5                                    | SHINAGAWA et al. (1977)  |
|                          | A-E                | 0,01 M PB, pH 5,7 / Stufengradient: 0,015-0,12 M PB, pH 6,0-7,2                                     | NOTERMANS et al. (1983)  |
| SP-Sepha-<br>dex (C-25)  | A                  | 0,01 M PCB**, pH 5,0 / Linearer Gradient: 0,01-0,025 M PCB, pH 5,0-7,5                              | ODA (1978)               |
|                          | B                  | 0,01 M PCB, pH 5,0 / Linearer Gradient: 0,01-0,05 M PCB, pH 5,0-7,5                                 | ODA (1978)               |
|                          | C <sub>2</sub>     | 0,01 M PCB, pH 5,0 / Linearer Gradient: 0,01 M PCB, pH 5,0-7,5                                      | ODA (1978)               |
|                          | D                  | 0,01 M PCB, pH 5,0 / Linearer Gradient: 0,01 M PCB, pH 5,0-0,025 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | ODA (1980)               |
|                          | E                  | 0,01 M PCB, pH 5,0 / Linearer Gradient: 0,01 M PCB, pH 5,0-0,015 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | ODA (1980)               |
| QAE-Sepha-<br>dex (A-50) | C <sub>2</sub>     | 0,033 M Äthylendi-<br>amin, pH 9,6 / 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4                                  | ROBERN et al. (1975a)    |

\*) PB = Phosphatpuffer

\*\*) PCB = Phosphatcitratpuffer

dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 bei einer Toxinausbeute von 85-90 % einen Reinheitsgrad von 20 % erzielt. EZEPOCHUK et al. (1981) sprechen bei der Abtrennung von SEA an Amberlite CG-50 von einer 134fachen Anreicherung, die Toxinausbeute dieser Autoren lag aber bei nur 37-40 %. SEB wurde durch Adsorption aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 bei einer Toxinausbeute von ca. 80 % 100fach angereichert (SCHANTZ et al., 1965), SEC<sub>3</sub> bei einer Toxinausbeute von ca. 45 % auf einen Reinheitsgrad von 20 % gebracht (REISER et al., 1984). Für SED haben CHANG und BERGDOLL (1979) mit diesem Trennungsgang einen Reinheitsgrad von 2 % erzielt, wobei ihre Toxinausbeute mit 90 % beachtlich war. MÜLLER (1981) jedoch erhielt, obwohl er unter gleichen Bedingungen arbeitete, SED mit nur einem Reinheitsgrad von 0,45 % und auch seine Ausbeute lag mit 79 % niedriger. Die Gewinnung von SEE aus dem Kulturüberstand durch Adsorption an Amberlite CG-50 erbrachte Toxin 1- bis 2%iger Reinheit. Nach dem Trennungsgang wurden noch ca. 40 % der ursprünglich im Kulturüberstand vorhandenen SEE-Menge wiedergefunden (BURKHARD, 1980).

In Verfahren zur Reinigung von SEB (SCHANTZ et al., 1965; BOWDEN, 1968) und SEC<sub>1</sub> (METZGER et al., 1975) wurden die SE nach Abtrennung aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 noch ein zweites Mal auf diesem Austauscher chromatographiert. Indem dabei das pH des Startpuffers gegenüber dem ersten Trennungsgang um 0,4 (SCHANTZ et al., 1965; BOWDEN, 1968) bzw. 0,6 pH-Einheiten (METZGER et al., 1975) auf pH 6,8 angehoben wurde, gelang es, weitere Verunreinigungen aus den Toxinpräparationen zu eliminieren. Der durch die zwei Abtrennungen an Amberlite CG-50 erzielte Reinheitsgrad von SEB wurde von SCHANTZ et al. (1965) mit 85 - 90 % (bei einer Toxinausbeute von 70 - 80 %) und von BOWDEN (1968) mit 96 - 100 % (bei einer Toxinausbeute von 40-60 %) angegeben.

SCHANTZ et al. (1965, 1972) berichteten, daß die Abtrennung der Enterotoxine A und B aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 mit einer starken Konzentrierung der Probenlösung einherging. So sollen SEA und SEB nach der Adsorption aus dem Kulturüberstand in einem Volumen von dem Austauscher eluiert worden sein, das 0,4 bzw. 1 % des Kulturüberstand-Ausgangsvolumens entsprach. FEY et al. (1984) aber erhielten bei der Abtrennung von SE aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 durchweg flache und breite Elutionspeaks und demzufolge stark verdünnte Enterotoxinlösungen. Daher verzichteten

diese Autoren auf den Einsatz von Amberlite CG-50 und führten die Gewinnung der Enterotoxine A-D aus dem Kulturüberstand mit CM-Cellulose durch. Unter den gewählten Trennbedingungen (Tab. 10) konnten SEB, SEC<sub>1</sub> und SED in deutlich abgesetzten und leicht zu isolierenden Peaks von der CM-Cellulose eluiert werden, wobei die Toxinausbeuten die folgenden waren: SEB 42%, SEC<sub>1</sub> 74,8%, SED 61 %. Für SEA jedoch ergab die Elution in der Säule eine schlechte Trennung und außerdem relativ niedrige Toxinausbeuten. Daher wurde SEA mittels der Batchmethode desorbiert. Mit dieser Chromatographiemethode erzielte SEA-Ausbeuten lagen bei 63,9 %.

ENDE et al. (1983) haben SEC<sub>1</sub> an CM-Cellulose aus dem Kulturüberstand abgetrennt. Im Unterschied zu FEY et al. (1984) führten diese Autoren die Elution mit einem in Stufen ansteigenden pH- und Ionenstärkegradienten (nach BORJA und BERGDOLL, 1967) durch (Tab. 10). Versuche von BURKHARD (1980), SEE an CM-Cellulose aus dem Kulturüberstand abzutrennen, scheiterten, da mit 0,02 M Phosphatpuffer (pH 5,6) äquilibrierte Cellulose SEE nur unzureichend adsorbierte.

CM-Sephadex (C-25) wurde von SHINAGAWA et al. (1975; 1977) und NOTERMANS et al. (1983) und SP-Sephadex (C-25) von ODA (1978; 1980) zur Abtrennung von SE aus dem Kulturüberstand eingesetzt. Die Chromatographie auf CM-Sephadex erfolgte mit Phosphat- und die auf SP-Sephadex mit Phosphat-citratpuffern (s. Tab. 10). Bemerkenswert ist, daß zur Elution der SE von CM- und SP-Sephadex ausschließlich Gradienten verwendet wurden. Während dies bei SHINAGAWA et al. (1975; 1977) und ODA (1978; 1980) kontinuierliche Gradienten waren, benutzten NOTERMANS et al. (1983) einen Stufengradienten, wodurch eine bessere Auflösung erzielt werden soll (NOTERMANS und DUFRENNE, 1982).

Bei der Abtrennung aus dem Kulturüberstand an SP-Sephadex wurden SEA, SEC<sub>2</sub> und SED in jeweils zwei und SEB und SEE in jeweils drei immunologisch identische Fraktionen aufgelöst. Eine Prüfung der SEB-, SED- und SEE-Fraktionen auf Kontaminationen mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Hämolysin ergab, daß die beiden SED-Komponenten vollständig frei von diesen Verunreinigungen waren. In den drei SEE- und in zwei der drei SEB-Fraktionen konnte hingegen noch  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Hämolysin nachgewiesen werden. Ohne das mit  $\alpha$ -Hämolysin kontaminierte Toxin zu berücksichtigen, wurde der Reinheitsgrad von SEB nach der Abtrennung an SP-

Sephadex mit 85,3 % ermittelt, wobei die Toxinausbeute 79,8 % betrug. Für SEA und SEC<sub>2</sub> soll durch Abtrennung aus dem Kulturüberstand an SP-Sephadex ein Reinheitsgrad von 90 bzw. 85,7 % erzielt worden sein. Als Toxinausbeute wurden für SEA 90,4 % und für SEC<sub>2</sub> 84,8 % angegeben (ODA, 1978; 1980).

Über den Einsatz von QAE-Sephadex (A-50) zur Adsorption von SE aus dem Kulturüberstand liegt nur eine Veröffentlichung vor (ROBERN et al., 1975a). Diese Autoren haben an QAE-Sephadex SEC<sub>2</sub> mit einer Toxinausbeute von 90 % abgetrennt. Als Eluens wurde dabei Äthylendiamin verwendet (Tab. 10).

Neben ihrem Einsatz zur Abtrennung der SE aus dem Kulturüberstand hat die Ionenaustauschchromatographie auch in späteren Stadien der SE-Reinigung Verwendung gefunden. So wurde an QAE-Sephadex aus dem Kulturüberstand abgetrenntes SEC<sub>2</sub> nach einem Zwischenschritt über Gelfiltration ein zweites Mal auf diesem Austauscher chromatographiert. Dabei kam als Eluens wieder Äthylendiamin zum Einsatz (Tab. 11), und die Toxinausbeute dieses Reinigungsschrittes betrug 40 - 50 % (ROBERN et al., 1975a).

Der Abtrennung von SE aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 folgte häufig eine Chromatographie auf CM-Cellulose (SCHANTZ et al., 1965 und 1972; TERAYAMA et al., 1974; METZGER et al., 1975; YAMADA et al., 1976; YAMADA, 1977a; CHANG und BERGDOLL, 1979; REISER et al. (1984), vereinzelt auch auf CM-Sephadex (YAMADA, 1977a). Für die Chromatographie auf CM-Cellulose bzw. CM-Sephadex wurden jeweils Phosphatpuffersysteme verwendet und zur Elution meist Gradienten eingesetzt (Tab. 11). Zweimal an Amberlite CG-50 aus dem Kulturüberstand abgetrenntes SEB konnte durch nachfolgende Chromatographie auf CM-Cellulose rein dargestellt werden, wobei die Toxinausbeute ca. 50-60 % betrug. Versuche, SEB mit CM-Cellulose direkt aus dem rohen Ausgangsmaterial zu isolieren, hatten wegen der großen Vielfalt verunreinigender Substanzen im Kulturüberstand hingegen keine befriedigenden Resultate erbracht (SCHANTZ et al., 1965). Für SEA und SEC<sub>3</sub> wurde durch CM-Cellulose-Chromatographie nach Abtrennung aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 ein Reinheitsgrad von 50 % bzw. von 80 % erzielt. Dabei betrug die Toxinausbeute an SEA etwa 53 % (SCHANTZ et al., 1972) und die an SEC<sub>3</sub> ca. 27 % (REISER et al., 1984). SED konnte, indem es nach Abtrennung aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 zweimal unter gleichen Bedingun-

gen auf CM-Cellulose chromatographiert wurde, mit einem Reinheitsgrad von 40 % gewonnen werden, wobei die Toxinausbeute 50 % betrug (CHANG und BERGDOLL, 1979).

In Verfahren zur Reinigung von SEA (SCHANTZ et al., 1972) und  $SEC_2$  (METZGER et al., 1975) wurde, nachdem die SE an Amberlite CG-50 aus dem Kulturüberstand abgetrennt und auf CM-Cellulose chromatographiert worden waren, noch eine weitere Ionenaustauschchromatographie auf Hydroxylapatit durchgeführt. Für die Hydroxylapatit-Chromatographie wurden dabei Phosphatpuffer verwendet, und die Elution der SE erfolgte jeweils mit einem in Stufen ansteigenden Ionenstärkegradienten. Durch die Hydroxylapatitchromatographie gelang es, den Reinheitsgrad von SEA von 50 auf 98 % anzuheben. Die Ausbeute an SEA nach den drei aufeinanderfolgenden Schritten über Ionenaustauschchromatographie betrug ca. 49 %.

Häufig schlossen sich auch der Konzentrierung des Kulturüberstandes durch Dialyse gegen PEG oder Ultrafiltration Reinigungsschritte über Ionenaustauschchromatographie an. Meist wurden die konzentrierten Rohtoxine auf CM-Cellulose chromatographiert (CHU et al., 1966; AVENA und BERGDOLL, 1967; BORJA und BERGDOLL, 1967; CHANG und DICKIE, 1971; LANGNER, 1971; BORJA et al., 1972; IGARASHI, 1972; LANGNER und KLOSS, 1974; KARSCH und RICHTER, 1979; BURKHARD, 1980) und dabei von mehreren Autoren (CHU et al., 1966, AVENA und BERGDOLL, 1967; LANGNER, 1971; IGARASHI, 1972; KARSCH und RICHTER, 1979) zwei Trennungsgänge hintereinander auf dem Austauscher durchgeführt. Die Bedingungen, unter denen die Chromatographie der konzentrierten Rohtoxine auf CM-Cellulose erfolgte, sind Tab. 11 zu entnehmen. SEA konnte durch zweifache Abtrennung aus dem konzentrierten Rohtoxin an CM-Cellulose bei einer Toxinausbeute von 55-60 % auf einen Reinheitsgrad von 70 % gebracht werden (CHU et al., 1966). Wurden aus den Elutionskurven der beiden Trennungsgänge jeweils nur die Kurvenmaxima ausgeschnitten, so lag der Reinheitsgrad des gewonnenen SEA sogar bei 84 % (LANGNER, 1971). Für  $SEC_1$  wurde ein Reinheitsgrad von 80 % bereits mit einer Abtrennung an CM-Cellulose erzielt. Da sich jedoch nach einer im Anschluß an die Chromatographie durchgeführten Dialyse ein unlösliches  $SEC_1$ -haltiges Sediment bildete, betrug die Toxinausbeute nach dem Reinigungsschritt nur etwa 30 % (BORJA und BERGDOLL, 1967). Von  $SEC_2$  wurde hingegen nach

Tab. 11: Reinigung von SE mittels Ionenaustauschchromatographie

| Ionenaustauscher   | SE-Typ         | Start- (Äquilibrierungs-) / Elutionsbedingungen                                                   | Autor(en)                |
|--------------------|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| Amberlite CG-50    | B              | 0,05 M PB* pH 6,8 / Stufengradient: 0,05-0,2 M PB, pH 6,8-6,2                                     | BERGDOLL et al. (1959a)  |
|                    | A              | 0,02 M PB, pH 6,0 / 0,2 M PB, pH 6,2                                                              | CASMAN u. BENNETT (1964) |
| CM-Celulose        | B              | 0,01 M PB, pH 6,2 / Linearer Gradient: 0,02-0,07 M PB, pH 6,2-6,8                                 | SCHANTZ et al. (1965)    |
|                    | A              | 0,01 M PB, pH 5,7 / 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                        | CHU et al. (1966)        |
|                    | A              | 0,01 M PB, pH 6,0 / Gradient: 0,01-0,05 M PB, pH 6,0-6,6**                                        | CHU et al. (1966)        |
|                    | C <sub>2</sub> | 0,02 M PB, pH 5,4 / 0,06 M PB, pH 6,6-6,7                                                         | AVENA u. BERGDOLL (1967) |
|                    | C <sub>2</sub> | 0,005 M PB, pH 5,8-5,9 / Linearer Gradient: 0,005-0,05 M PB, pH 5,8-5,9**                         | AVENA u. BERGDOLL (1967) |
|                    | C <sub>1</sub> | 0,01 M PB, pH 5,5 / Stufengradient: 0,02-0,06 M, pH 6,0-6,8                                       | BORJA u. BERGDOLL (1967) |
|                    | B              | 0,01 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,01-0,067 M PB, pH 5,7-7,4                                | CHANG u. DICKIE (1971)   |
|                    | B              | 0,01 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,01-0,067 M PB, pH 5,7-7,4                                | CHANG et al. (1971a)     |
|                    | E              | 0,02 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03-0,1 M PB, pH 6,1-7,0                                     | BORJA et al. (1972)      |
|                    | D              | 0,01 M PB, pH 5,8 / 0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                                        | IGARASHI (1972)          |
|                    | D              | 0,01 M PB, pH 5,8 / 0,07 M PB, pH 6,8**                                                           | IGARASHI (1972)          |
|                    | A              | 0,01 M PB, pH 6,0 / Linearer Gradient: 0,01-0,05 M PB, pH 6,0-6,8                                 | SCHANTZ et al. (1972)    |
|                    | D              | 0,01 M PB, pH 5,2 / 0,15 M PB, pH 8,3                                                             | LANGNER u. KLOSS (1974)  |
|                    | E              | 0,01 M PB, pH 5,6 / 0,07 M PB, pH 6,8                                                             | TERAYAMA et al. (1974)   |
|                    | C <sub>1</sub> | 0,01 M PB, pH 6,2 / Linearer Gradient: 0,02-0,07 M PB, pH 6,2-6,8                                 | METZGER et al. (1975)    |
|                    | C <sub>2</sub> | 0,01 M PB, pH 6,0 / Linearer Gradient: 0,01-0,05 M PB, pH 6,0-6,8                                 | METZGER et al. (1975)    |
|                    | A              | 0,01 M PB, pH 5,6 / 0,07 M PB, pH 6,8                                                             | YAMADA et al. (1976)     |
|                    | B              | 0,02 M PB, pH 6,2 / Linearer Gradient: 0,02-0,07 M PB, pH 6,2                                     | YAMADA (1977a)           |
|                    | A,D,E          | 0,01 M PB, pH 5,6 / 0,07 M PB, pH 6,8                                                             | YAMADA (1977a)           |
|                    | D              | 0,02 M PB, pH 5,8 / Linearer Gradient: 0,03-0,06 M PB, pH 6,1-6,8                                 | CHANG u. BERGDOLL (1979) |
|                    | A-E            | 0,01 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 5,7 / 0,07 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,8 | KARSCH u. RICHTER (1979) |
|                    | F              | 0,02 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03-0,1 M PB, pH 6,1-7,0                                     | BURKHARD (1980)          |
|                    | E              | 0,02 M PB, pH 5,2 / Stufengradient: 0,03-0,1 M PB, pH 6,1-7,0                                     | BURKHARD (1980)          |
|                    | E              | 0,01 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03-0,1 M PB, pH 6,1-7,0                                     | BURKHARD (1980)          |
|                    | C <sub>3</sub> | 0,005 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03-0,045 M PB, pH 6,0-6,2                                  | REISER et al. (1984)     |
| CM-Sephadex        | B              | 0,01 M PB, pH 6,5 / Gradient: 0,01-0,1 M PB, pH 6,5                                               | HALLANDER (1966)         |
| CM-Sephadex (C-25) | C <sub>2</sub> | 0,03 M PB, pH 5,6 / Linearer Gradient: 0,03-0,1 M PB, pH 5,6                                      | YAMADA (1977a)           |

Zeichenerklärung siehe nächste Seite

| Ionenaustauscher     | SE-Typ           | Start- (Äquilibrierungs-) / Elutionsbedingungen                                                  | Autor(en)                     |
|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| CM-Sephacrose CL 6B  | E                | 0,02 M PB, pH 5,6 / Stufengradient: 0,03 0,1 M PB, pH 6,1 7,0                                    | BURKHARD (1980)               |
| Phospho-Cellulose    | B                | 0,01 M PB, pH 6,5 / Gradient: 0,01-0,1 M PB, pH 6,5                                              | HALLANDER (1966)              |
| DEAE-Cellulose       | D                | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / 0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5                                      | IGARASHI (1972)               |
|                      | D                | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / Konkaver Gradient: 0-0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5**)              | IGARASHI (1972)               |
|                      | E                | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / 0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5                                      | TERAYAMA et al. (1974)        |
|                      | E                | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / Linearer Gradient: 0-0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5**)              | TERAYAMA et al. (1974)        |
|                      | C <sub>2</sub>   | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / Linearer Gradient: 0-0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5                 | YAMADA (1977a)                |
|                      | D,E              | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / 0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5                                      | YAMADA (1977a)                |
|                      | D,E              | 0,05 M Glycin, pH 9,5 / Linearer Gradient: 0-0,3 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5**)              | YAMADA (1977a)                |
|                      | E                | 0,01 M Trispuffer, pH 9,6 / Stufengradient: 0,025-1,0 M NaCl in 0,01 M Trispuffer, pH 9,6        | BURKHARD (1980)               |
|                      | E                | 0,01 M PB, pH 8,6 / Stufengradient: 0,025-1,0 M NaCl in 0,01 M PB, pH 8,6                        | BURKHARD (1980)               |
|                      | A                | 0,005 M Trispuffer, pH 7,2 / - ***)                                                              | EZECHUK et al. (1981)         |
| DEAE-Sephadex (A-25) | A,C,E            | 0,025 M Glycin, pH 9,5 / Linearer Gradient: 0,025 M Glycin - 0,2 M NaCl in 0,05 M Glycin, pH 9,5 | SHINAGAWA et al. (1975; 1977) |
| OAE-Sephadex (A-50)  | C <sub>2</sub>   | 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4 / 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4                                    | ROBERN et al. (1975a)         |
|                      | A,C <sub>2</sub> | 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4 / 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4                                    | ROBERN et al. (1975b)         |
| Hydroxylapatit       | A                | 0,03 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,2-0,4 M PB, pH 5,7                                      | SCHANTZ et al. (1972)         |
|                      | C <sub>2</sub>   | 0,03 M PB, pH 5,7 / Linearer Gradient: 0,2-0,4 M PB, pH 5,7                                      | METZGER et al. (1975)         |

## Zeichenerklärung:

- \*) PB = Phosphatpuffer
- \*\*) Rechromatographie
- \*\*\*) Ionenaustauschchromatographie über negative Adsorption durchgeführt.

zweifacher Abtrennung an CM-Cellulose noch ein Anteil von 50% der ursprünglich im Kulturüberstand vorhandenen Toxinmenge wiedergefunden (AVENA und BERGDOLL, 1967). SED soll durch Fraktionierung des konzentrierten Rohtoxins mit CM-Cellulose auf ca. 40% angereichert werden können (LANGNER und KLOSS, 1974). Für SEE geben BORJA et al. (1972) den durch diesen Trennungsgang bei einer Toxinausbeute von 40-50% erzielten Reinheitsgrad mit 8% an. BURKHARD (1980) erhielt bei der CM-Cellulose-Chromatographie von konzentriertem SEE-Rohtoxin allerdings wesentlich schlechtere Ergebnisse. Dies war darauf zurückzuführen, daß die CM-Cellulose SEE nur ungenügend adsorbierte. Da die Adsorption auch nicht verbessert werden konnte, wenn Startpuffer mit geringerer Ionenstärke oder niedrigerem pH eingesetzt wurden, führte BURKHARD (1980) orientierende Versuche zur Trennung von SEE-Rohtoxin mit CM-Sepharose CL-6B und DEAE-Cellulose durch. Unter den gewählten Trennbedingungen (Tab. 11) wurden jedoch auch mit diesen Austauschern keine befriedigenden Ergebnisse erzielt.

CASMAN et al. (1967) haben bei der Reinigung von SED Amberlite CG-50 zur Chromatographie des konzentrierten Rohtoxins eingesetzt. Dabei erfolgte die Chromatographie unter den Bedingungen, mit denen SCHANTZ et al. (1965) SEB an Amberlite CG-50 aus dem Kulturüberstand abgetrennt haben (Tab. 10), und auch die nächsten beiden Reinigungsschritte - Rechromatographie auf Amberlite CG-50 und Ionenaustauschchromatographie auf CM-Cellulose - wurden nach SCHANTZ et al. (1965) durchgeführt. Verschiedene Untersuchungen deuteten jedoch darauf hin, daß der Reinheitsgrad von SED nach den drei Reinigungsschritten nur 10% betrug (BERGDOLL, 1970).

Japanische Untersucher (IGARASHI, 1972; TERAYAMA et al., 1974; YAMADA, 1977a; SHINAGAWA, 1975 und 1977) haben den amphoteren Charakter der SE zu deren Reinigung durch aufeinanderfolgende Chromatographie auf Kationen- und Anionenaustauschern genutzt. Dabei wurde die Anionenaustauschchromatographie in erster Linie durchgeführt, um  $\alpha$ -Hämolysin aus den SE-Herstellungen zu eliminieren. IGARASHI (1972) chromatographierte zu diesem Zweck SED, das an CM-Cellulose aus dem konzentrierten Rohtoxin abgetrennt worden war, nach einem Zwischenschritt über Gelfiltration zweimal auf DEAE-Cellulose. Später hat man sein Verfahren modifiziert und die Enterotoxine C<sub>2</sub>, D und E an Amberlite CG-50 aus dem Kulturüberstand abgetrennt, bevor -

nach einem weiteren Reinigungsschritt mit CM-Cellulose bzw. CM-Sephadex - eine DEAE-Cellulose-Chromatographie erfolgte. SED und SEE wurden zur vollständigen Abtrennung des  $\alpha$ -Hämolysins dabei zweimal hintereinander auf der DEAE-Cellulose chromatographiert (TERAYAMA et al., 1974; YAMADA, 1977a). SHINAGAWA et al. (1975 und 1977) führten bei der Reinigung der Enterotoxine A, C und E eine Anionenaustauschchromatographie auf DEAE-Sephadex (A-25) durch, nachdem die SE an CM-Sephadex (C-25) aus dem Kulturüberstand abgetrennt worden waren. Für die Chromatographie auf DEAE-Cellulose und auf DEAE-Sephadex wurde hier jeweils ein Glycinpuffer (pH 9,5) verwendet, dem man zur Elution NaCl zusetzte. Dabei erfolgte die Elution entweder durch einen einfachen Anstieg der Salzkonzentration, meist aber mit einem kontinuierlich ansteigenden NaCl-Gradienten (Tab. 11).

Verfahren zur Reinigung von SE, in denen die Ionenaustauschchromatographie erst nach Anwendung anderer Reinigungstechniken zur Anwendung kam, sind selten. Dazu zählen zum einen die Verfahren von HALLANDER (1966), CHANG et al. (1971a) und ROBERN et al. (1975b), in denen der Ionenaustauschchromatographie die Fraktionierung des Rohtoxins durch Gelfiltration vorausging. ROBERN et al. (1975b) ließen in ihrem Verfahren zur Reinigung von SEA und SEC<sub>2</sub> der Gelfiltration eine Anionenaustauschchromatographie auf QAE-Sephadex (A-50) folgen. Die an dem Ionenaustauscher abgetrennten SE sollen dabei hochgradig rein gewesen sein (ohne Prozentangaben) und die Toxinausbeute der QAE-Sephadex-Chromatographie wurde mit 40-50 % angegeben. HALLANDER (1966) und CHANG et al. (1971a) reinigten jeweils SEB. HALLANDER (1966) führte nach der Gelfiltration eine Ionenaustauschchromatographie auf Phospho-Cellulose oder CM-Sephadex durch, CHANG et al. (1971a) chromatographierten das durch Gelfiltration vorgereinigte Toxin auf CM-Cellulose. Für die Toxinausbeute der Phospho-Cellulose- und CM-Sephadex-Chromatographie ermittelte HALLANDER (1966) Werte zwischen 10 und 85 %.

Weitere Verfahren mit erstmaligem Einsatz der Ionenaustauschchromatographie in einem späteren Reinigungsstadium wurden von BERGDOLL et al. (1959a), CASMAN und BENNETT (1964) und EZEPCHUK et al. (1981) beschrieben. In den Verfahren von CASMAN und BENNETT (1964) und BERGDOLL et al. (1959a) wurde durch Fällungsreaktionen vorgereinigtes SEA bzw. durch Fällungsreaktionen und Adsorption an Aluminiumoxid vorgereinigtes SEB auf Amberlite CG-50 chromatographiert. EZEPCHUK et al. (1981) haben SEA,

das mit Ammoniumsulfat aus dem Kulturüberstand ausgefällt worden war, einer Ionenaustauschchromatographie mit DEAE-Cellulose unterzogen. Die Bedingungen der DEAE-Cellulose-Chromatographie (Tab. 11) wurden dabei so gewählt, daß nicht SEA, sondern die kontaminierenden Proteine an den Austauscher adsorbiert wurden (negative Adsorption). Mit dieser Methode wurde SEA bei einer Toxinausbeute von 41,6 % etwa 2,5fach angereichert.

#### **2.3.4.3 Ausschlußchromatographie (Gelfiltration)**

Bei der Ausschlußchromatographie werden poröse Materialien als Molekularsieb eingesetzt, um Moleküle nach ihrer Größe und Form zu trennen. Handelt es sich bei den porösen Materialien um sogenannte Gele, so bezeichnet man diese Methode auch als Gelfiltration. Gele sind polymere organische Verbindungen, deren dreidimensionale Struktur ein Netzwerk von hydrophilen Poren besitzt. Die zuerst entwickelten Gele waren die Sephadex-Polydextrane (PORATH und FLODIN, 1959). Heute sind noch verschiedene andere Geltypen im Handel, so z.B. Polyacrylamidgele (Handelsname Biogel-P), Agarosegele (Sephacrose, Bio-Gel A) und ein weiteres Dextrangel mit dem Handelsnamen Sephacryl, das sich von Sephadex unter anderem durch seine höhere mechanische Widerstandsfähigkeit unterscheidet. Die einzelnen Geltypen sind mit einem Spektrum unterschiedlicher Porengrößen erhältlich und können daher zur Trennung in verschiedenen Molekülgrößenbereichen eingesetzt werden. Sephadex und Biogel-P sind auch in verschiedenen Partikelgrößen verfügbar. Die Partikelgröße beeinflusst die Trennschärfe eines Gels. Je kleiner die Partikel, desto bessere Auflösung kann erwartet werden.

Zur Reinigung der SE mittels Gelfiltration haben vereinzelt Sephacryl S-200 (ODA, 1980) und Biogel P-60 (EZEPCHUK et al., 1974) Verwendung gefunden, überwiegend aber kam Sephadex zum Einsatz, und zwar in den durch die Typennummern G-25, G-50, G-75 und G-100 bezeichneten Vernetzungsgraden. Die Vernetzungsgrade G-75 und G-100 wurden außerdem in verschiedenen Partikelgrößen benutzt (Tab. 12). Als Elutionsmittel wurden bei der Gelfiltration der SE meist Phosphatpuffer verwendet, die des öfteren NaCl enthielten (Tab. 12). Bei der Gelfiltration von SED (YAMADA, 1977a) und SEE (BORJA et al., 1972) hat man die Phosphatpuffer auch mit einem Zusatz von Harnstoff versehen. Harnstoff sprengt die Wasserstoffbrückenbindungen eines Proteins und

Tab. 12: Reinigung von SE mittels Gelfiltration

| Gel-Typ                   | SE-Typ              | Elutionsmittel                                    | Autor(en)                    |
|---------------------------|---------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|
| Sephadex G-25             | A                   | ?                                                 | FLUER und RYBASOVA (1981)    |
|                           | B                   | ?                                                 | FLUER (1983)                 |
| Sephadex G-50             | C <sub>2</sub>      | 0,02 M PB*, pH 6,8                                | AVENA und BERGDOLL (1967)    |
|                           | C <sub>1</sub>      | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | BORJA und BERGDOLL (1967)    |
| Sephadex G-50 Fine        | B                   | 1 % Glycin                                        | CHANG et al. (1971a)         |
|                           | D                   | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | IGARASHI (1972)              |
| Sephadex G-75             | C <sub>2</sub>      | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | AVENA und BERGDOLL (1967)    |
|                           | C <sub>1</sub>      | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | BORJA und BERGDOLL (1967)    |
|                           | D                   | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | CASMAN et al. (1967)         |
|                           | A                   | 1,0 M NaCl in 0,05 M PB, pH 6,8                   | SCHANTZ et al. (1972)        |
|                           | E                   | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | TERAYAMA et al. (1974)       |
|                           | A                   | 1,0 M NaCl in 0,05 M PB, pH 6,8                   | SHINAGAWA et al. (1975)      |
|                           | C                   | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | SHINAGAWA et al. (1975)      |
|                           | A                   | 0,01 M PB, pH 6,5                                 | YAMADA et al. (1976)         |
|                           |                     |                                                   | YAMADA (1977a)               |
|                           | C <sub>2</sub> ,D,E | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | YAMADA (1977a)               |
|                           | D                   | 0,05 M PB, pH 6,8 mit 6 M Harnstoff               | YAMADA (1977a)               |
|                           | A,B,C <sub>2</sub>  | 0,01 M PB, pH 7,4                                 | ODA (1978)                   |
|                           | D                   | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | CHANG und BERGDOLL (1979)    |
|                           | A-E                 | 0,5 M NaCl in 0,05 M PB, pH 6,8                   | NOTERMANS et al. (1983)      |
|                           | A                   | ?                                                 | JANIN et al. (1984)          |
|                           | C <sub>3</sub>      | 1,0 M NaCl in 0,05 M PB, pH 6,8                   | REISER et al. (1984)         |
| Sephadex G-75 Medium**)   | A                   | 0,005 M PB, pH 6,85                               | CHU et al. (1966)            |
| Sephadex G-75 Superfine   | E                   | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | BORJA et al. (1972)          |
|                           | E                   | 0,02 M PB, pH 6,8 mit 6 M Harnstoff               | BORJA et al. (1972)          |
| Sephadex G-100            | B                   | 0,02 M PB, pH 6,8                                 | FREA et al. (1963)           |
|                           | A                   | 0,05 M PB, pH 6,85                                | CHU et al. (1966)            |
|                           | B                   | 0,1 M NaCl in 0,02 M PB, pH 7,2                   | HALLANDER (1966)             |
|                           | B                   | 0,069 M PB, pH 7,4                                | CHANG und DICKIE (1971)      |
|                           | B                   | 0,069 M PB, pH 7,4                                | CHANG et al. (1971a)         |
|                           | A                   | 0,05 M PB, pH 6,8                                 | LANGNER (1971)               |
|                           | D                   | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | IGARASHI (1972)              |
|                           | A,C <sub>2</sub>    | 0,033 M Äthylendiamin, pH 6,4                     | ROBERN et al. (1975a; 1975b) |
|                           | A,C <sub>2</sub>    | 0,1 M Ammoniumlumbicarbonatpuffer, pH 8,1         | ROBERN et al. (1975a; 1975b) |
|                           | B                   | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | YAMADA (1977a)               |
|                           | A-E                 | 0,05 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 6,85 | KARSCH und RICHTER (1979)    |
|                           | B                   | 0,15 M NaCl in 0,067 M PB, pH 7,4                 | MELCONIAN et al. (1983)      |
| Sephadex G-100 Superfine  | D                   | 0,34 M NaCl in 0,02 M PB, pH 6,5                  | LANGNER und KLOSS (1974)     |
|                           | E                   | 0,05 M PB, pH 6,5                                 | SHINAGAWA et al. (1977)      |
| Sephacryl S-200 Superfine | D,E                 | 0,01 M PB, pH 7,4                                 | ODA (1980)                   |
| Bio-Gel P-60              | A                   | 0,003 M NaCl, pH 7,0                              | EZEPCUK et al. (1974)        |

\*) PB = Phosphatpuffer

\*\*) heute nicht mehr im Handel

destabilisiert die hydrophoben Bindungen. Dies hat eine Vergrößerung des Stokeschen Radius und damit in der Gelfiltration ein verändertes Trennverhalten zur Folge. Neben den Phosphatpuffern sind zur Elution der SE vereinzelt auch NaCl-Lösung (EZEPCHUK et al., 1974), Äthylendiamin (ROBERN et al., 1975a, 1975b), Glycin (CHANG et al., 1971a) und die flüchtige Puffersubstanz Ammoniumbicarbonat (ROBERN et al., 1975a; 1975b) verwendet worden.

HALLANDER (1963) hat unter Verwendung verschiedener Sephadex-Typen die Eignung der Gelfiltration zur Auftrennung von SEB-Rohtoxin untersucht. Er stellte fest, daß mittels Gelfiltration zwar eine Fraktionierung des Rohtoxins, aber keine Auflösung einzelner Exoproteine möglich ist. Infolgedessen wurde die Gelfiltration bei der SE-Reinigung immer mit auf anderen Parametern beruhenden Trenntechniken kombiniert, wobei sie wegen ihres begrenzten Probenvolumens überwiegend in späteren Stadien der Reinigung zum Einsatz kam.

Zunächst war die Gelfiltration bei der Reinigung von SE mit Alkoholfällung und/oder Elektrophorese kombiniert worden (FREA et al., 1963; HALLANDER, 1966; EZEPCHUK et al., 1974). Später wurden die schwerfälligen Elektrophorese- und Fällungsmethoden (BERGDOLL, 1967) durch Ionenaustauschchromatographie ersetzt. Aus Tab. 13 geht hervor, daß, um die Reindarstellung der SE mittels Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie zu erreichen, die beiden Trenntechniken häufig mehrfach angewendet werden mußten. Insbesondere in jüngerer Zeit wurde die Gelfiltration neben der Ionenaustauschchromatographie noch mit isoelektrischer Fokussierung kombiniert, wobei zur Reindarstellung der SE mit einer Ausnahme auf die Wiederholung der einzelnen Reinigungsmethoden verzichtet werden konnte (s. Abschnitt 2.3.5.2). Bei der Reinigung von SEA wurde die Gelfiltration auch in Verbindung mit Chromatofokussierung eingesetzt. Die Chromatofokussierung erfolgte dabei unter den Bedingungen der Hochdruck-Chromatographie (s. Abschnitt 2.3.4.6).

Tab. 13: Aus Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration bestehende Verfahren zur Reinigung von SE

| Reinigungsschritte                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | gereinigte SE-Typen | Reinheit der Reinigungsprodukte                                                 | SE-Ausbeute der Verfahren | Autor(en)                  |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75 Medium                                                                                                     | A                   | > 95 %                                                                          | ca. 35 %                  | CHU et al. (1966)          |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>3. CM-Sephadex- oder Phospho-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie                                                                                                                                                                           | B                   | ?                                                                               | 10-85 %                   | HALLANDER (1966)           |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>6. Gelfiltration an Sephadex G-50                                                                        | C <sub>2</sub>      | > 99 %                                                                          | ca. 40 %                  | AVENA und BERG-DOLL (1967) |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-50<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-50                                                                                                                         | C <sub>1</sub>      | ca. 98 %                                                                        | ca. 20 %                  | BORJA und BERG-DOLL (1967) |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>4. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                           | D                   | wahrscheinlich < 10 %*)                                                         | ?                         | CASMAN et al. (1967)       |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-50 Fine                                                                                                                                                        | B                   | ?                                                                               | ?                         | CHANG et al. (1971a)       |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100                                                                                                                                                 | A                   | hochgradig rein (ohne Prozentangaben)                                           | ?                         | LANGNER (1971)             |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-75 Superfine<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-75 Superfine<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75 Superfine in Anwesenheit von 6 M Harnstoff                                                          | E                   | Reinigungsprodukt nahezu homogen in SDS-PAGE**) und in Doppelgeldiffusionstests | ?                         | BORJA et al. (1972)        |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>5. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>6. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>7. Gelfiltration an Sephadex G-50 fine | D                   | < 20 %***)                                                                      | ?                         | IGARASHI (1972)            |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Hydroxylapatit-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                                       | A                   | > 99 %                                                                          | ca. 20 %                  | SCHANTZ et al. (1972)      |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-100 Superfine                                                                                                                                                                                        | D                   | < 20 %***)                                                                      | 15 %                      | LANGNER und KLOSS (1974)   |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                    | E                   | Reinigungsprodukt homogen in Disc-PAGE                                          | ?                         | TERAYAMA et al. (1974)     |
| 1. QAE-Sephadex (A-50)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>3. QAE-Sephadex (A-50)-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100                                                                                                                                        | C <sub>2</sub>      | hochgradig rein (ohne Prozentangaben)                                           | ca. 30 %                  | ROBERN et al. (1975a)      |

Zeichenerklärung siehe nächste Seite

Fortsetzung Tabelle 13

| Reinigungsschritte                                                                                                                                                                                                                                                                                                | gereinigte SE-Typen | Reinheit der Reinigungsprodukte                      | SE-Ausbeute der Verfahren                           | Autor(en)                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>3. QAE-Sephadex (A-50)-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100                                                                                                                                       | A,C <sub>2</sub>    | hochgradig rein (ohne Prozentangaben)                | 32-45 %                                             | ROBERN et al. (1975b)                  |
| 1. CM-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. DEAE-Sephadex (A-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                                                                 | A,C                 | ?                                                    | ?                                                   | SHINAGAWA et al. (1975)                |
| 1. CM-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. DEAE-Sephadex (A-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-100 Superfine<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100 Superfine                                                                                                      | E                   | im wesentl. rein (ohne Prozentangaben)               | ?                                                   | SHINAGAWA et al. (1977)                |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                                                                            | A                   | > 99 %                                               | 36 %                                                | YAMADA et al. (1976)<br>YAMADA (1977a) |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-100                                                                                                                                                                           | B                   | ?                                                    | 40 %                                                | YAMADA (1977a)                         |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>3. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                   | C <sub>2</sub>      | ?                                                    | ca. 10 %                                            | YAMADA (1977a)                         |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75 oder Gelfiltration an Sephadex G-75 in Anwesenheit von 6 M Harnstoff | D                   | Reinigungsprodukt noch kontaminiert mit Fremdprotein | ?                                                   | YAMADA (1977a)                         |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                      | E                   | ?                                                    | ca. 5 %                                             | YAMADA (1977a)                         |
| 1. SP-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                                                                                                                          | A,B,C <sub>2</sub>  | 100 %                                                | SEA 85,2 %<br>SEB 73,5 %<br>SEC <sub>2</sub> 83,3 % | ODA (1978)                             |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>5. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                      | D                   | > 99 %                                               | ca. 20 %                                            | CHANG und BERGDOLL (1979)              |
| 1. SP-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. Gelfiltration an Sephacryl S-200 Superfine                                                                                                                                                                                                              | D,E                 | ?                                                    | SED 70 %<br>SEE 36 %                                | ODA (1980)                             |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-75                                                                                                                                                                            | C <sub>3</sub>      | ≥ 96 %****)                                          | 20 %                                                | REISER et al. (1984)                   |

\*) nach BERGDOLL (1970)

\*\*) SDS-PAGE = SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

\*\*\*) nach CHANG und BERGDOLL (1979)

\*\*\*\*) bei Reinigung aus dem Rohtoxin von *S. aureus* FRI-913

#### 2.3.4.4 Chromatofokussierung

Bei der noch relativ jungen Technik der Chromatofokussierung (CF) werden Proteine säulenchromatographisch nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. Dies geschieht, indem man unter Verwendung von Pufferampholyten auf einem Ionenaustauscher einen pH-Gradienten herstellt und an den Austauscher gebundene Ionen mit diesem pH-Gradienten eluiert. Aufgrund der dabei zustandekommenden Fokussiereffekte ist die CF hinsichtlich der Auflösung der klassischen Ionenaustauschchromatographie weit überlegen.

Im Rahmen der Niederdruckchromatographie wurde die CF bisher nur von ENDE et al. (1983) und FEY et al. (1984) zur Reinigung von Enterotoxinen eingesetzt. ENDE et al. (1983) reinigten SEB und SEC<sub>1</sub> durch Chromatofokussierung. Vorher hatten sie die SE an Ionenaustauschern aus dem Kulturüberstand abgetrennt, mittels Gelfiltration entsalzt und  $\alpha$ -Hämolysin durch Adsorption an Kaninchenerythrozytenmembranen eliminiert. Die CF erfolgte dann an dem speziell für diese Technik entwickelten Polybufferaustauscher PBE 94 (Pharmacia) mit einem Gradienten, der unter Verwendung von Pharmalyten, Typ 6,5-9 (Pharmacia) für SEB im Bereich von pH 9,5 - 8,0 und für SEC<sub>1</sub> im Bereich von pH 9,5 bis 7,5 hergestellt worden war. Dabei wurden SEB in drei und SEC<sub>1</sub> in sechs Fraktionen mit unterschiedlichen pI-Werten aufgelöst. Die SEB- und SEC<sub>1</sub>-Fraktionen erwiesen sich in der Sodiumdodecylsulfat (SDS)-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) jeweils als homogen, und eine Überprüfung des Reinheitsgrades ergab, daß die Fraktionen weder Hämolysine noch Desoxyribonuklease, Staphylokinase, Protease oder Protein A enthielten. Die Gesamtaubeute an SEB und SEC<sub>1</sub> nach der CF betrug jeweils 60 %.

FEY et al. (1984) haben SEA, SEB und SEC<sub>1</sub>, das zuvor an CM-Cellulose aus dem Kulturüberstand abgetrennt worden war, über CF gereinigt. Die CF erfolgte dabei an dem Polybufferaustauscher PBE 94 mit einem Polybuffer 96 (Pharmacia)-pH-Gradienten, der für SEA im Bereich von pH 9,5-6,0 und für SEB und SEC<sub>1</sub> im Bereich von pH 9,6 ( $\pm$  0,1) - 7,0 etabliert worden war. Nach der CF wurde von SEB noch ein Anteil von 23,9 % der auf die CF-Säule aufgetragenen Toxinmenge wiedergefunden. Der Reinheitsgrad der bei der CF gewonnenen SE war folgender: SEA 92,2 %, SEB 81,4 %, SEC<sub>1</sub> 90,3 %. Im übrigen haben FEY et al. (1984) auch versucht, SED über CF zu reinigen, dabei aber keine befriedigende Auflösung erhalten.

Die bei der CF zur Elution bzw. zur Bildung des Gradienten verwendeten Pufferampholyte (Polybuffer, Pharmalyte) bestehen aus Peptidmolekülen, und es kann erforderlich sein, z.B. beim biologischen Einsatz der Reinigungsprodukte oder wenn nach der CF weitere Reinigungsschritte durchgeführt werden sollen, diese Peptidmoleküle von den Proteinen abzutrennen. ENDE et al. (1983) haben festgestellt, daß Pharmalyte von SEB und SEC<sub>1</sub> leicht durch Gelfiltration an Sephadex G-50 abgetrennt werden können, nicht aber Polybuffer. Dies wird damit erklärt, daß Polybuffer aus längeren Peptidketten als Pharmalyte bestehen und in der Gelfiltration wesentlich höhere Molgewichte simulieren. Versuche von ENDE et al. (1983), Polybuffer mit den anderen vom Hersteller dafür vorgeschlagenen Methoden (Fällung, Hydrophobe Chromatographie und Affinitätschromatographie) von den SE abzutrennen, waren jeweils mit hohen Toxinverlusten verbunden.

#### 2.3.4.5 Affinitätschromatographie

Die Affinitätschromatographie hängt im Gegensatz zu den anderen Reinigungsmethoden nicht von Unterschieden in den physikochemischen Eigenschaften der zu trennenden Moleküle ab, sondern ihr Reinigungseffekt beruht auf der Ausnutzung der biologischen Funktion oder individuellen chemischen Struktur von Biomolekülen. Basis der Affinitätschromatographie ist die kovalente Bindung eines biospezifischen Liganden an eine unlösliche, feste Matrix. Trägt man eine Mischung mit dem zu isolierenden Molekül auf diese Matrix auf, so "erkennt" das gewünschte Molekül seinen Liganden und bindet sich an ihn, während die anderen Substanzen ausgewaschen werden können. Die gewünschte Komponente erhält man, indem die Eigenschaften der Elutionslösung so verändert werden, daß die gebundenen Makromoleküle von den Liganden abdissoziieren.

Obwohl die Affinitätschromatographie eine hochspezifische Trennmethode ist, wurde sie zur SE-Reinigung bisher nur von KUO und GENIGEORGIS (1978) eingesetzt. Diese Autoren haben, um SEA und SEB zu binden, durch enzymatische Spaltung von spezifischem Immunglobulin G (IgG) entstandene F(ab')<sub>2</sub>-Fragmente an Cyanbromid-aktivierte Sepharose-4B gekoppelt. Mit Hilfe dieses Immunoadsorbens gelang es, SEA und SEB in einem einstufigen Prozeß aus den Kulturen zu isolieren. Die Trennung wurde auf analytischer Basis durchgeführt. Da jedoch das Immunoadsorbens nach Abtrennen der SE vom Ligan-

den regeneriert und wiederholt benutzt werden konnte, bezeichneten KUO und GENIGEORGIS (1978) die Affinitätschromatographie als vielversprechende Methode zur Reinigung auch größerer SE-Mengen.

#### 2.3.4.6 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Außer bei der Chromatofokussierung sind die Trennschärfen der bisher erwähnten Chromatographiemethoden nicht sehr hoch und lassen sich nicht mit denen vergleichen, die man bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (im Engl. HPLC = high pressure (performance) liquid chromatography) erhält (DUPPEL, 1982). Bei dieser Technik werden, um der durch Diffusionsvorgänge bedingten Verbreiterung durch die Trennsäule wandernder Substanzzonen entgegenzuwirken, Trennmaterialien mit möglichst kleinen Partikeln eingesetzt. Je kleiner die Partikel, um so höher ist die Trennschärfe, um so größer aber auch der dem Lösungsmitteldurchfluß entgegengesetzte Widerstand. Dieser Widerstand wird durch entsprechende Hochdruckpumpen überwunden, wodurch es gelingt, trotz des aufgebauten Gegendrucks hohe Flußraten und kurze Trennzeiten zu erzielen.

WILLIAMS et al. (1983) haben die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zur Reinigung von SEB eingesetzt. Dabei wurde eine Ausschluß-, eine Kationen- und Anionenaustausch- und eine "reversed-phase"-Chromatographie (= Adsorptionschromatographie mit chemisch modifizierten, unpolaren Adsorbentien) unter den Bedingungen der Hochdruckchromatographie durchgeführt (Tab. 14). Ausschlußchromatographie sowie Kationen- und Anionenaustauschchromatographie dienten jeweils zur Trennung von SEB-Rohtoxin. Durch Ausschlußchromatographie gelang es, das Rohtoxin in ca. sechs Fraktionen aufzulösen, von denen die im Molekulargewichtsbereich von 23.000 - 25.000 eluierte Fraktion das SEB enthält. Die Untersuchung dieser SEB-Fraktion in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese ergab neben dem SE das Vorhandensein einer Reihe anderer Proteine mit Molgewichten im Bereich von 12.000 - 18.000. Diese Proteine konnten auch nicht abgetrennt werden, wenn die Ausschlußchromatographie mit einem Eluenten hoher Ionenstärke oder in Anwesenheit von Guanidinhydrochlorid durchgeführt wurde. Die Versuche, SEB-Rohtoxin durch Anionenaustauschchromatographie aufzutrennen, scheiterten vollständig, da der verwendete Anionenaustauscher SEB unter den gewählten Trennbedingungen nicht ad-

Tab. 14: Reinigung von SEB mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (nach WILLIAMS et al., 1983)

| Trennsystem                      | Trennsäule                                          | Eluent                                                                                                                                                                            | Durchflußrate<br>(ml/min) |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| Ausschlußchromatographie         | MicroPak*) TSK 3000SW<br>(0,8 x 30 cm)              | 0,1 M KCl in 0,067 M Phosphatpuffer, pH 6,8                                                                                                                                       | 1,0                       |
| Kationenaustauschchromatographie | Micro Pak TSK IEX 530CM<br>(0,4 x 30 cm)            | Puffer A: 0,005 M Ammoniumacetat, pH 5,7<br>Puffer B: 1,0 M Ammoniumacetat, pH 6,5<br>Elutionsprogramm: 1) Puffer A für 16 min<br>2) Linearer Gradient zu 40 % Puffer B in 60 min | 0,5                       |
| Anionenaustauschchromatographie  | Synchropak**) AX-300                                | NaCl- oder Ammoniumacetat-Gradienten                                                                                                                                              | ?                         |
| "reversed-phase" Chromatographie | Micro Pak C <sub>18</sub> -Protein<br>(0,4 x 30 cm) | Puffer A: 0,1 % TFA ***<br>Puffer B: 0,1 % TFA in Wasser-1-Propanol (40:60)<br>Elutionsprogramm: Linearer Gradient 0-100 %<br>Puffer B in 30 min                                  | 1,0                       |

\*) Micro Pak (Varian Instr.)

\*\*) Synchropak (Synchrom)

\*\*\* TFA = Trifluoressigsäure

sorbierte. Durch Kationenaustauschchromatographie hingegen konnte das Rohtoxin in ca. 16 Fraktionen aufgelöst werden, von denen vier SEB-Spezifität aufwiesen. Bei der Untersuchung dieser vier SEB-Fraktionen in der SDS-PAGE ließen drei neben der SE-Bande, die einem Molgewicht von ca. 28.000 zuzuordnen war, jeweils noch zwei weitere Komponenten, entsprechend einem Molgewicht von 12.500 und 14.000, erkennen.

Die "reversed-phase"-Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie wurde mit SEB durchgeführt, das vorher nach CASMAN und BENNETT (1963) gereinigt worden sein soll (in der Arbeit von CASMAN und BENNETT (1963) ist allerdings kein Reinigungsverfahren beschrieben). Dabei wurde nur eine einzelne Fraktion von der Säule eluiert. Diese Fraktion wies - wie bereits durch Ausschluß- und Kationenaustauschchromatographie gereinigtes SEB - in der SDS-PAGE neben der SE-Bande weitere niedermolekulare Komponenten auf. Das Auftreten niedermolekularer Komponenten in allen ihren Reinigungsprodukten veranlaßte WILLIAMS et al. (1983) zu der Überlegung, daß es sich dabei möglicherweise um via Disulfidbrückenbindung mit dem Toxin assoziierte Peptide handelte, die unter PAGE-Bedingungen freigesetzt wurden. Um dies zu prüfen, erfolgte eine "reversed-phase"-Chromatographie von gereinigtem SEB in Anwesenheit des Mercaptoäthanol und SDS enthaltenden Elektrophoresepuffers. Das dabei erhaltene Material zeigte sich in der SDS-PAGE homogen, wies aber keine serologische und biologische Aktivität mehr auf.

Unter dem Namen "fast protein liquid chromatography" (FPLC) (Pharmacia) ist ein System von Trennmedien und Geräten auf dem Markt, das speziell für die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Proteinen entwickelt wurde. JANIN et al. (1984) haben dieses System bei der Reinigung von SEA, SEC<sub>1</sub> und SED eingesetzt (für SEA, nachdem das konzentrierte Rohtoxin durch Gelfiltration fraktioniert worden war und für SEC<sub>1</sub> und SED nach Abtrennung der SE aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50). Dabei wurden jeweils die Mono-P-Säulen des FPLC-Systems für Chromatofokussierung verwendet und die Trennung an diesen Säulen mit einem Polybuffer 96-pH-Gradienten von pH 9-6 und einer Durchflußrate von 1 ml/min durchgeführt. Der Reinheitsgrad nach der Trennung an Mono-P betrug für SEA 98 %, für SEC<sub>1</sub> 95 % und für SED 80 %.

### 2.3.5 Reinigung von SE mittels elektrophoretischer Methoden

#### 2.3.5.1 Elektrophorese

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen im elektrischen Feld. Teilchen, die sich in ihrer Ladung, Größe und Form unterscheiden, wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Auf dieser Basis beruht die elektrophoretische Trennung geladener Stoffgemische. Die Elektrophorese kann in freier Lösung (trägerfreie Elektrophorese) oder in einem stabilisierenden Medium (Träger- oder Zonelektrophorese) durchgeführt werden. Als stabilisierende Medien dienen z.B. Dichtegradienten, Papier, Celluloseacetatfolien, Stärke-, Agarose- und Polyacrylamidgele sowie granulierten Medien (z.B. graunulierte Stärke und Agarose, granuliertes Polyacrylamid, Cellulose und Sephadex) in Form von Blocks oder Säulen (SOBER et al., 1965; BERGER und OHLENSCHLÄGER, 1984).

Zur Reinigung von SE wurde Elektrophorese in Stärkeblocks, in Sephadex- und Cellulosesäulen, in Polyacrylamidgelen und in Saccharose-Dichtegradienten beschrieben. Die Stärkeblock-Elektrophorese diente zur Reinigung von SEA, SEB und SED und erfolgte jeweils bei pH 6,0. SEB wurde nach Vorreinigung durch Fällungsreaktionen, Adsorption an Aluminiumoxid und Ionenaustauschchromatographie auf Amberlite CG-50 in der Stärkeblock-Elektrophorese eingesetzt. Dabei gelang die Abtrennung von sechs Verunreinigungen mit antigener Wirksamkeit (BERGDOLL et al., 1959a). Die Versuche, SEA außer durch Fällungsreaktionen und Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie mittels Stärkeblock-Elektrophorese zu reinigen (CASMAN und BENNETT, 1964), ergaben Toxinherstellungen 25- bis 30%iger Reinheit (KATO et al., 1966). Bei der Reinigung von SED wurde die Stärkeblock-Elektrophorese zur Abtrennung von  $\alpha$ -Hämolyysin eingesetzt. Es konnten jedoch nur ca. 80 % des  $\alpha$ -Hämolyisins eliminiert werden, die anderen 20 % befanden sich in einer der beiden etwa gleichstarken SED-Fractionen, in die das Toxin während des Elektrophoreselaufs aufgetrennt wurde. Die Wiederfindungsrate an SED bei diesem Reinigungsschritt betrug 93 % (CASMAN et al., 1967). Da die Stärkeblock-Elektrophorese in ihrer Durchführung schwerfällig ist (BERGDOLL, 1967), wurde sie später nicht mehr zur Reinigung von SE eingesetzt. Allerdings wies BENNETT (1971) darauf hin, daß sich Elektrophorese in Stärke möglicherweise gut zur Trennung von SE und  $\beta$ -Hämolyysin eignet, da Stärke gegenüber diesen beiden *S.aureus*-Exoproteinen offenbar ein unterschiedliches Adsorptionsverhalten aufweist.

Versuche zur elektrophoretischen Trennung von SEB in Sephadexsäulen wurden von FREA et al. (1963) und HALLANDER (1966) vorgenommen, und zwar jeweils mit SEB. FREA et al. (1963) führten diese Versuche bei pH 6,0 nach Vorreinigung des Toxins durch Alkoholfällung und Gelfiltration an Sephadex G-100 durch. Sie haben mit ihrem Verfahren aber nur eine Teilreinigung von SEB erzielen können (SCHANTZ et al., 1965; BERGDOLL, 1967). HALLANDER (1966) setzte durch Gelfiltration an Sephadex G-100 vorgereinigtes SEB in der Sephadexsäulen-Elektrophorese ein. Indem er die Elektrophorese zweimal hintereinander durchführte - zuerst bei pH 8,4 oder pH 8,15 und dann bei pH 5,95 - gelang es ihm, SEB zu isolieren. HALLANDER (1966) untersuchte auch die Trennung von SEB in Cellulosepudersäulen. In diesem Trägermaterial genügte nach der Gelfiltration an Sephadex G-100 bereits ein bei pH 8,4 oder pH 8,15 durchgeführter Elektrophoreselauf, um SEB zu isolieren. Das ist wahrscheinlich dadurch bedingt, daß Verunreinigungen von Cellulosepuder stärker adsorbiert werden. Bei der Elektrophorese entstanden HALLANDER (1966) Toxinverluste, die bis zu 76 % betrugen. Als Erklärung wurde eine Denaturierung von SEB während der Elektrophorese vermutet. So hatte HALLANDER (1966) festgestellt, daß ein in einem Dialysierschlauch befindliches, einer Spannung von 50 V und einer Stromstärke von 2 mA ausgesetztes SEB nach 24 h nur noch 50 - 75 % seiner serologischen Ausgangsaktivität aufwies.

Die Polyacrylamidgel-Elektrophorese diente zur Reinigung von SEA und SEE und wurde in Form der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese (Disc-PAGE) durchgeführt, wobei das kationische Puffersystem nach REISFELD et al. (1962) zur Anwendung kam. SEE wurde nach Vorreinigung durch CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration an Sephadex G-75 in der Disc-PAGE eingesetzt. Indem die Disc-PAGE in Anwesenheit von 8 M Harnstoff erfolgte, gelang es, störende Antigene von SEE abzutrennen und das Toxin zu isolieren. Jedoch resultierten Stromstärken von mehr als 2 mA in einer Zerstörung der antigenen Eigenschaften von SEE. Dies wurde auf die Einwirkung der bei hohem Stromfluß entstehenden Hitze in Verbindung mit niedrigen pH-Werten zurückgeführt (BORJA et al., 1972). SEA soll durch die Disc-PAGE in einem Schritt aus dem konzentrierten Rohtoxin abgetrennt werden können (DENNY et al., 1966; TAN et al., 1969). Die Disc-PAGE wurde jeweils auf analytischer Basis durchgeführt. Versuche, diese Methode auf größere SE-Mengen zu übertragen, blieben ohne Erfolg (BERGDOLL, 1970).

Die Elektrophorese in Saccharose-Dichtegradienten diente zur Reinigung von SEB (CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971a) und SEC<sub>2</sub> (CHANG et al., 1971b) und wurde jeweils mit 0,025 M Boratpuffer (pH 9,2) durchgeführt. Angaben zur Wiederfindungsrate bei dieser Elektrophoreseform und zum Reinheitsgrad der abgetrennten SE liegen nicht vor.

#### 2.3.5.2 Isoelektrische Fokussierung

Die auf KOLIN (1958) und SVENSSON (1961; 1962) zurückgehende isoelektrische Fokussierung (IEF) ist eine biochemische Trennmethode, die ebenso wie die Chromatofokussierung eine Trennung aufgrund unterschiedlicher isoelektrischer Punkte (pI) bewirkt. Vom Prinzip her ist die IEF eine Elektrophorese in einem pH-Gradienten: Probenkomponenten wandern unter Einfluß eines elektrischen Feldes im pH-Gradienten bis zu ihrem pI, an dem sie ihre Nettoladung und damit ihre elektrophoretische Mobilität verlieren. Sie werden am pI konzentriert (fokussiert). Der pH-Gradient wird unter Verwendung sogenannter Trägerampholyte aufgebaut, die man einem stabilisierenden Medium zusetzt. Für die präparative IEF kommen am häufigsten Dichtegradient-Säulen sowie mit granulierten Gelen stabilisierte Systeme zum Einsatz. Die IEF im Dichtegradienten, die zuerst entwickelt wurde, ist mit verschiedenen Nachteilen verbunden. Dazu gehören lange Fokussierzeiten sowie die Vermischung von "in situ" getrennten Substanzen bei der Elution.

Zur Reinigung von SE wurde überwiegend IEF in Zucker-Dichtegradient-Säulen beschrieben (CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971b; YAMADA, 1977a; KARSCH und RICHTER, 1979; FLUER und RYBASOVA, 1981; FLUER, 1983; MELCONIAN et al., 1983), vereinzelt hat man die SE aber auch in Ultradex- (MÜLLER, 1981; FEY et al., 1984) und Sephadex G-75 Superfine-Flachgelen (NOTERMANS et al., 1983) fokussiert. Die Fokussierung erfolgte jeweils mit Ampholine-pH-Gradienten, die meist im alkalischen Bereich liegen (Tab. 15).

Tab. 15: Verfahren zur Reinigung von SE mit präparativer isoelektrischer Fokussierung (IEF)

| Reinigungsschritte                                                                                                                                                                                                                                          | gereinigte SE-Typen | Reinheit der Reinigungsprodukte                      | SE-Ausbeute der Verfahren | Autor(en)                          |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------|
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Zonelektrophorese in Dichtegradient-Säulen<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-50 fine (Äquibrierungsschritt)<br>5. IEF in einem 7-10 pH-Gradienten            | B                   | ?                                                    | ?                         | CHANG und DICKIE (1971)            |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-50 fine (Äquibrierungsschritt)<br>4. IEF in einem 7-10 pH-Gradienten                                                             | B                   | ?                                                    | ?                         | CHANG und DICKIE (1971)            |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. Zonelektrophorese im Dichtegradienten<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-50 fine (Äquibrierungsschritt)<br>4. IEF in einem 3-10 pH-Gradienten                                                                  | C <sub>2</sub>      | ?                                                    | ?                         | CHANG et al. (1971b)               |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. DEAE-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>5. IEF in einem 3-10 pH-Gradienten               | D                   | Reinigungsprodukt noch kontaminiert mit Fremdprotein | ?                         | YAMADA (1977a)                     |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>3. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>4. Gelfiltration an Sephadex G-100<br>5. IEF in einem 5-11 pH-Gradienten<br>6. Gelfiltration an Sephadex G-100 | A-E                 | Reinigungsprodukte homogen in Geldiffusionstests     | ?                         | KARSCH und RICHTER (1979)          |
| 1. Konzentrierung des Kulturüberstandes<br>2. IEF in einem 3,5-10 pH-Gradienten                                                                                                                                                                             | D                   | ?                                                    | 19 %                      | MÜLLER (1981)                      |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. IEF in einem 3,5-10 pH-Gradienten<br>3. IEF in einem 6-9 pH-Gradienten                                                                                                                               | D                   | > 95 % *)                                            | 28 %                      | MÜLLER (1981)<br>FEY et al. (1984) |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. IEF in einem 6-8 pH-Gradienten<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-25                                                                                                                                  | A                   | Reinigungsprodukt serologisch spezifisch             | ?                         | FLUER und RYBASOVA (1981)          |
| 1. Amberlite CG-50-Ionenaustauschchromatographie<br>2. IEF in einem 7-9 pH-Gradienten<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-25                                                                                                                                  | B                   | Reinigungsprodukt serologisch spezifisch             | ?                         | FLUER (1983)                       |
| 1. Biorex 70-Ionenaustauschchromatographie<br>2. IEF in einem 8-11 pH-Gradienten<br>3. Gelfiltration an Sephadex G-100                                                                                                                                      | B                   | ca. 99 %                                             | 9 %                       | MELCONIAN et al. (1983)            |
| 1. CM-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>3. IEF in einem 5-9 pH-Gradienten                                                                                                                               | A,D,E               | Reinigungsprodukte homogen in SDS-PAGE               | ?                         | NOTERMANS et al. (1983)            |
| 1. CM-Sephadex (C-25)-Ionenaustauschchromatographie<br>2. Gelfiltration an Sephadex G-75<br>3. IEF in einem 7-11 pH-Gradienten                                                                                                                              | B,C <sub>1</sub>    | Reinigungsprodukte homogen in SDS-PAGE               | ?                         | NOTERMANS et al. (1983)            |
| 1. CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie<br>2. IEF in einem 6-9 pH-Gradienten                                                                                                                                                                          | D                   | 74,4 %                                               | ?                         | FEY et al. (1984)                  |

\*) Reinheit der beiden toxinreichsten Fraktionen aus IEF (insgesamt ca. 20 % des zur Reinigung eingesetzten Toxins).

Mit einer Ausnahme (MÜLLER, 1981) wurde die IEF bei der Reinigung von SE immer in Verbindung mit anderen Trenntechniken eingesetzt. In den Verfahren kanadischer Autoren (CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971b), die sich zur Reinigung von SE als erste der präparativen IEF bedienten, handelte es sich bei diesen anderen Trenntechniken auch um Zonenelektrophorese. Später wurde die IEF nur noch mit Ionenaustauschchromatographie bzw. Ionenaustauschchromatographie und Gelfiltration kombiniert. Dabei erzielte Ergebnisse sind in Tab. 15 zusammengefaßt.

Die bei der IEF zum Aufbau des pH-Gradienten verwendeten Ampholine bestehen ebenso wie die bei der Chromatofokussierung benutzten Pufferampholyte aus Peptidmolekülen. Um die Ampholine nach erfolgter Fokussierung von den SE abzutrennen, wurden Gelfiltration an Sephadex G-50 (CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971b) bzw. G-75 (MÜLLER, 1981), Ultrafiltration (CHANG und DICKIE, 1971) sowie Dialyse (MÜLLER, 1981) beschrieben.

Nach Angaben von FEY et al. (1984) eignet sich von diesen Methoden nur die Ultrafiltration zur Abtrennung der Ampholine. Die Ultrafiltration SED-haltiger Lösungen war jedoch mit hohen Toxinverlusten verbunden.

#### **2.3.6. Konzentrieren, Entsalzen und Äquilibrieren SE-haltiger Lösungen**

In mehrstufigen Verfahren zur Reinigung der SE ist es häufig notwendig, die Probenlösung zu konzentrieren, zu entsalzen und zu äquilibrieren. Für diese Aufgaben wurden verschiedene Methoden benutzt. Die Entsalzung und Äquilibrierung SE-haltiger Lösungen erfolgte fast ausschließlich durch Dialyse. Vereinzelt wurde zu diesem Zweck jedoch auch Gelfiltration an Sephadex G-50 durchgeführt (CHANG und DICKIE, 1971; CHANG et al., 1971b; ENDE et al., 1983).

Die mit Abstand am häufigsten verwendete Konzentrierungsmethode ist die Lyophilisation. Es existieren nur wenig Reinigungsverfahren, bei denen diese Methode keinen Eingang gefunden hat (SCHANTZ et al., 1965; HALLANDER, 1966; IGARASHI, 1972; ROBERN et al., 1975a; ODA, 1978; 1980; ENDE et al., 1983). Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Lyophilisation nicht ausschließlich der Konzentrierung diene, sondern häufig auch erfolgte, um die teilweise gereinigten SE in eine stabile Form zu überführen. Neben der Lyophilisation

wurden zur Konzentrierung SE-haltiger Lösungen Evaporation (HALLANDER, 1966; ENDE et al., 1983), Ultrafiltration (CASMAN und BENNETT; 1964; IGARASHI, 1972; ROBERN et al., 1975a; 1975b; ODA, 1978, 1980) und Dialyse gegen PEG (CASMAN et al., 1967; IGARASHI, 1972, CHANG und BERGDOLL, 1979, REISER et al., 1984) eingesetzt.

Nach ENDE et al. (1983) sind Konzentrierungs-, Entsalzungs- und Äquilibrationsschritte über Membrantrennungen (Dialyse, Hohlfaserdialyse, Ultrafiltration) mit hohen Toxinverlusten (bis zu 80 %) assoziiert, da SE sich irreversibel an künstliche Membranen binden sollen. Die Evaporation (mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit Kühlfalle) bezeichnen diese Autoren hingegen als verlustfrei arbeitende Konzentrierungsmethode. Mittels Gelfiltration an Sephadex G-50 gelang es ihnen, große Volumina SEB- und SEC<sub>1</sub>-haltiger Lösungen mit Toxinverlusten von weniger als 10 % zu entsalzen.

### 3. Eigene Untersuchungen

#### 3.1 Produktion von SED

##### 3.1.1 Material

Folgende SED-bildenden *S. aureus*-Stämme wurden eingesetzt:

- SED-Staphylococcus aureus 472
- SED-Staphylococcus aureus 494
- SED-Staphylococcus aureus 1151m

Alle drei Stämme waren dem Institut vom Food Research Institute Madison, Wis. (USA) zur Verfügung gestellt worden und wurden an Porzellanperlen angetrocknet aufbewahrt, um eine Abschwächung des Enterotoxinbildungsvermögens zu vermeiden (BAUMGART, 1970).

Die Nährmedien für die Anreicherungskulturen der Stämme und für die Toxinproduktion wurden mit Brain Heart Infusion (BHI)-Bouillon (Oxoid), Proteinhydrolysaten (Serva) und den Zusätzen Thiamin, Niacin und Hefeextrakt (alle Serva) hergestellt. Die Proteinhydrolysate im einzelnen waren:

- Pepton aus Casein C/ELP; enzymatisch hydrolysiert, leichtlöslich; Spezialpepton mit physiologischem Salzgehalt
- Pepton aus Casein C/ELB; enzymatisch hydrolysiert, leichtlöslich
- Pepton aus Casein C/ESX; enzymatisch hydrolysiert, schwerlöslich
- Pepton aus Casein C/HSB; HCl hydrolysiert
- Pepton aus Casein C/TLG; tryptisch hydrolysiert, leichtlöslich
- Pepton aus Lactalbumin L/ELG; enzymatisch hydrolysiert, leichtlöslich
- Pepton aus Soja S/ELB; enzymatisch hydrolysiert, leichtlöslich

Bei der Bildung von SED mit dem "sac-culture"-Verfahren kamen Visking-Dialysierschläuche, Type 36/32 der Fa. Serva, zum Einsatz. Der MANCINI-Test wurde mit SED und Anti-SED-Serum der Fa. Serva durchgeführt.

### **3.1.2 Methodik**

#### **3.1.2.1 Quantitativer Nachweis von SED**

Der quantitative Nachweis von SED in den Kulturüberständen erfolgte mit der Einfachgel-Diffusionstechnik nach MANCINI et al. (1965). Dabei wurde das Anti-SED-Serum in einer Verdünnung von 1:20 verwendet. Das Referenztoxin wurde in A. dest. gelöst und zur Erstellung einer Eichkurve in Konzentrationen von 0,5; 1; 2; 3; 4 und 5 µg/ml eingesetzt. Um plattenabhängige Unterschiede auszuschalten, wurde für jede Platte eine gesonderte Eichkurve erstellt.

#### **3.1.2.2 Prüfung des SED-Bildungsvermögens von Staphylococcus aureus-Stämmen**

Die Untersuchung der Enterotoxigenität der S. aureus-Stämme 472, 494 und 1151m erfolgte mit dem "sac-culture"-Verfahren nach DONELLY et al. (1967). Hierzu wurden in Erlenmeyerkolben (1 l) jeweils ein mit 200 ml doppelt konzentrierter (7,4%iger) BHI-Bouillon gefüllter Dialysierschlauch eingelegt und die Kolben autoklaviert (120° C, 15 min).

Zur Anzüchtung der SED-Bildner wurden von jedem Stamm ein bis zwei Perlen in 10 ml einer 3,7%igen BHI-Bouillon verbracht und bis zur Trübung der Nährbouillon bebrütet (erste Vorkultur). Die erste Vorkultur wurde in 50 ml einer 3,7%igen BHI-Bouillon überführt (zweite Vorkultur), und nach 24 h Bebrütung bei 37° C wurden die Stämme aus der zweiten Vorkultur auf Blutplatten überimpft.

Die Kultur jeweils einer Blutplatte wurde mit 2 ml steriler physiologischer Phosphatpufferlösung abgeschwemmt und zusammen mit 18 ml Phosphatpuffer in einen der vorbereiteten, den Dialysierschlauch enthaltenden Kolben verbracht. Für jeden Stamm wurden zwei "sac-cultures" angesetzt und davon die eine 24 und die andere 48 h im Schüttelbrutschrank bei 37° C und 200 U/min bebrütet. Vor der Enterotoxinbestimmung wurden die Kulturen 20 min bei 10.000 U/min und 4° C zentrifugiert.

### **3.1.2.3 Produktion von SED in flüssigen Nährmedien**

In dieser Versuchsreihe wurden unter Verwendung von *S. aureus* 1151m die Eignung verschiedener flüssiger Medien zur Produktion von SED, ebenso wie der Einfluß verschiedener anderer Faktoren (Zusätze, Inkubationszeit und -temperatur, Schüttelgeschwindigkeit, pH-Wert und Belüftung) geprüft. Die Bestimmung des Enterotoxingehaltes in den einzelnen Kulturen erfolgte nach 20 min Zentrifugieren bei 10.000 U/min in der Kühlzentrifuge.

#### **3.1.2.3.1 Vorkulturverfahren**

Um die Induktionsphase von *S. aureus* 1151m in den Hauptkulturen abzukürzen, wurde der Stamm in einem Anreicherungsverfahren in 3,7%iger BHI-Bouillon oder einem aus 3 % C/ELP und 3 % C/ESX unter Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin hergestellten Medium vorkultiviert. Dazu wurden ein bis zwei mit *S. aureus* 1151m beladene Porzellanperlen in 10 ml Medium angezüchtet (erste Vorkultur).

Die erste Vorkultur wurde in 50 ml Nährmedium überführt und 24 h bei 37° C bebrütet (zweite Vorkultur). 20 ml der zweiten Vorkultur wurden in 200 ml Nährmedium überimpft und erneut 24 h bei 37° C bebrütet (dritte Vorkultur).

Für die Untersuchungen zur Produktion von SED in verschiedenen Nährmedien erfolgte die Inokulation mit der in 3,7%iger BHI-Bouillon gewonnenen dritten Vorkultur. Alle nachfolgenden Versuche wurden mit der im Peptonmedium bebrüteten dritten Vorkultur durchgeführt.

#### **3.1.2.3.2 Nährmedien**

Im ersten Versuchsabschnitt wurden verschiedene Peptone auf ihre Eignung für die Produktion von SED geprüft. Zudem wurde getestet, ob durch Kombination einiger Peptone eine Steigerung der gebildeten Toxinmengen möglich ist. Folgende Peptone sowie Kombinationen von Peptonen kamen zu Anwendung:

- C/ELP
- C/ESX
- C/HSB

- C/TLG
- L/ELG
- S/ELB
- C/ELB und C/ESX
- C/ELP und C/ESX
- C/ELP und C/HSB
- C/ELP und C/TLG
- C/ELP und L/ELG
- C/ELP und S/ELB

Aufgrund von Erfahrungen des Instituts bei der Produktion anderer Enterotoxintypen wurden die Peptone für diesen Versuch als 4%ige Lösung angesetzt. Bei der Kombination von zwei Peptonen betrug die Konzentration der Einzelkomponenten 3 %. Alle Nährmedien erhielten einen Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin. Die Medien wurden auf pH 6,8 eingestellt, zu je 200 ml in Erlenmeyerkolben (2 l) abgefüllt und autoklaviert (120° C, 15 min). Nach Abkühlung der Nährmedien wurden jeweils 4 ml der in BHI-Bouillon angezüchteten dritten Vorkultur hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Bebrütung über 24 h bei 37° C und 275 U/min.

#### **3.1.2.3.3 Schüttelgeschwindigkeiten und Inkubationszeiten**

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Schüttelgeschwindigkeiten und Inkubationszeiten wurde das aus 3 % C/ELP und 3 % C/ESX unter Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin hergestellte Medium auf pH 6,8 eingestellt und zu je 200 ml in Erlenmeyerkolben (2 l) abgefüllt. Die Kolben wurden mit 4 ml der im gleichen Medium hergestellten dritten Vorkultur beimpft. Jeweils zwei Kolben wurden 24, 36 und 48 h bebrütet, wovon der eine dann mit 175 U/min und der andere mit 275 U/min geschüttelt wurde.

#### **3.1.2.3.4 pH-Werte und Bebrütungstemperaturen**

Um den optimalen Anfangs-pH-Wert zu ermitteln, wurde das Medium aus C/ELP und C/ESX mit Zusatz von Thiamin und Niacin auf pH-Werte im Bereich von 6,6 - 7,6 mit Abständen von jeweils 0,2 pH eingestellt. Zur gleichzeitigen Prü-

fung des Einflusses der Bebrütungstemperatur wurden zwei Erlenmeyerkolben mit je 200 ml Medium einer pH-Wert-Stufe gefüllt, wovon der eine bei 37° C und der andere bei 40° C bebrütet wurde. Alle anderen Versuchsbedingungen wurden beibehalten wie unter 3.1.2.3.2 beschrieben.

#### **3.1.2.3.5 Zusätze**

In diesem Versuchsabschnitt wurde geprüft, ob durch Zusatz von 1 % Hefeextrakt oder 1 % Hefeextrakt, 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin zum Basalmedium (3 % C/ELP und 3 % C/ESX) eine Verbesserung der Enterotoxinproduktion zu erzielen ist. Das Medium wurde auf pH 7,2 eingestellt. Alle übrigen Bedingungen wurden gewählt wie unter 3.1.2.3.2 beschrieben. Zur Kontrolle lief das Basalmedium unter Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin mit.

#### **3.1.2.3.6 Belüftung des Mediums**

Es wurde getestet, ob die bislang verwendete Nährbodenmenge (200 ml in 2 l Erlenmeyerkolben) beibehalten werden sollte oder ob durch eine Erhöhung der Nährbodenmenge auf 400 ml, trotz der damit einhergehenden verschlechterten Sauerstoffübertragung, die Toxinausbeute gesteigert werden kann. Der Versuch wurde mit 200 ml und 400 ml aus 3 % C/ELP und 3 % C/ESX, pH 7,2, unter Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin hergestelltem Medium durchgeführt. Die Medien wurden mit jeweils 2,5 % (v/v) der dritten Vorkultur beimpft und 48 h bei 37° C und 275 U/min bebrütet.

#### **3.1.2.4 Produktion von SED mit dem "sac-culture"-Verfahren**

Die Produktion von SED mit der "sac-culture"-Technik erfolgte in Anlehnung an NOTERMANS und DUFRENNE (1982) auf der Basis des Verfahrens nach DONNELLY et al. (1967). Hierzu wurde ein mit 400 ml doppelkonzentrierter (7,4%iger) BHI-Bouillon gefüllter Dialysierschlauch von ca. 1,30 m Länge in einen Erlenmeyerkolben gelegt und der Kolben autoklaviert (120° C, 15 min). Anschließend wurde die beim Autoklavieren aus dem Dialysierschlauch in den Kolben ausgetretene Flüssigkeit entfernt.

Zur Herstellung des Inokulums wurden ein bis zwei mit *S. aureus* 1151m beladene Porzellanperlen in 10 ml einer 3,7%igen BHI-Bouillon angezüchtet und mit dieser Kultur Schräg-BHI-Agarröhrchen beimpft. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wurden die Staphylokokkenkulturen mit je 2 ml steriler 0,01 M Phosphatpufferlösung, pH 7,4, vom Schrägagar abgeschwemmt und 4 ml der gewonnenen Bakteriensuspension in eine mit BHI-Agar gefüllte Roux-Flasche (1 l) verbracht. Die Roux-Flasche wurde 24 h bei 37°C bebrütet und anschließend die Bakterienkultur mit 20 ml steriler 0,01 M Phosphatpufferlösung, pH 7,4, aus der Flasche abgeschwemmt und mit dem gleichen Puffer 1:10 verdünnt.

Der mit dem Dialyseschlauch beschickte Kolben wurde mit 50 ml der verdünnten Bakteriensuspension beimpft und 40 h im Schüttelbrutschrank bei 37°C und 110 U/min bebrütet.

Nach Entnahme der Bakteriensuspension aus dem Kolben wurde dieser noch zweimal mit jeweils ca. 50 ml A.dest. gespült. Spülflüssigkeit und Bakteriensuspension wurden vereinigt und 20 min bei 10.000 U/min und 4°C zentrifugiert.

### 3.1.3 Ergebnisse

Bei der Prüfung der Enterotoxigenität der *S. aureus*-Stämme 472, 494 und 1151m mit der "sac-culture"-Technik zeigte *S. aureus* 1151m mit Abstand das stärkste Enterotoxinbildungsvermögen. Nach 48 h Bebrütung waren im Kulturüberstand dieses Stammes 6,6 µg SED/ml nachzuweisen, während der Überstand von *S. aureus* 472 nur 1,6 µg SED/ml enthielt. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h, die allerdings zu durchweg schlechteren Ergebnissen führte, wurde im Kulturüberstand des Stammes 1151m die höchste Toxinkonzentration gefunden. Die Toxinkonzentration in den Kulturüberständen des Stammes 494 lag mit weniger als 0,5 µg/ml unterhalb der Nachweisgrenze des MANCINI-Tests.

Unter Verwendung des Stammes 1151m wurden aus verschiedenen Peptonen bzw. Kombinationen verschiedener Peptone hergestellte Nährmedien auf ihre Eignung zur Produktion von SED untersucht. In Tab. 16 sind die mit den unterschiedlichen Medien erhaltenen Toxinkonzentrationen wiedergegeben. Das aus den Peptonen C/ELP und C/ESX hergestellte Medium erwies sich als am geeignetsten für die SED-Produktion. Mit diesem Medium wurde daher der Ein-

Tab. 16: Konzentration von SED in verschiedenen Medien\*) nach 24 h  
Bebrütung bei 37° C.

| Medium        | SED<br>(µg/ml) |
|---------------|----------------|
| C/ELP         | 1,2            |
| C/ESX         | 1,2            |
| C/HSH         | 0,2            |
| C/TLG         | 0,5            |
| L/ELG         | 1,0            |
| S/ELB         | 1,3            |
| C/ELB + C/ESX | 2,4            |
| C/ELP + C/ESX | 3,1            |
| C/ELP + C/HSH | 1,0            |
| C/ELP + C/TLG | 2,5            |
| C/ELP + L/ELG | 1,6            |
| C/ELP + S/ELB | 1,5            |

\*) Alle Medien waren mit einem Zusatz von 0,001 % Niacin und  
0,00005 % Thiamin versehen.

fluß verschiedener anderer Faktoren auf die Produktion von SED geprüft.

Zur Ermittlung des Einflusses von Schüttelgeschwindigkeit und Inkubationszeit wurden je zwei Kulturen bei 37°C 24, 36 und 48 h im Schüttelbrutschrank inkubiert, die eine mit 175, die andere mit 275 U/min. Bei der Schüttelgeschwindigkeit von 275 U/min wurde stets mehr Enterotoxin gebildet als bei 175 U/min. Mit zunehmender Inkubationszeit stieg die Toxinkonzentration an (Tab. 17).

Tab. 17: Einfluß verschiedener Inkubationszeiten und Schüttelgeschwindigkeiten auf die Bildung von SED im Medium aus C/ELP und C/ESX mit Zusatz von Thiamin und Niacin; Bebrütung bei 37 ° C.

| Inkubations-<br>zeit (h) | SED (µg/ml)                          |           |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------|
|                          | Schüttelgeschwindigkeit<br>175 U/min | 275 U/min |
| 24                       | 0,74                                 | 0,87      |
| 36                       | 0,81                                 | 1,0       |
| 48                       | 0,96                                 | 1,4       |

Um das für die SED-Synthese optimale Anfangs-pH festzustellen, wurde das Nährmedium auf pH-Werte im Bereich von 6,6 - 7,6 im Abstand von jeweils 0,2 pH eingestellt und zur gleichzeitigen Bestimmung der optimalen Bebrütungstemperatur Medium jeder pH-Wert-Stufe jeweils bei 37° C oder bei 40° C bebrütet. Das Ausgangs-pH des Mediums, bei dem am meisten SED gebildet wurde, lag für die beiden Bebrütungstemperaturen unterschiedlich. Die Bebrütung bei 40° C erbrachte die höchste Toxinkonzentration im Medium mit einem Ausgangs-pH von 7,6 und die Bebrütung bei 37° C im Medium mit einem Ausgangs-pH von 7,2. Die insgesamt höchste Toxinkonzentration wurde in dem auf einen Anfangs-pH-Wert von 7,6 eingestellten und bei 40° C bebrüteten Medium nachgewiesen (Tab. 18).

In den vorausgegangenen Versuchen waren dem Medium jeweils 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin zugesetzt worden. Nun wurde geprüft, ob durch den Zusatz von 1 % Hefeextrakt oder von 1 % Hefeextrakt, 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin eine Steigerung der SED-Synthese möglich ist. Durch den Zusatz von Hefeextrakt sowie von Hefeextrakt in Kombination mit den Vitaminen konnte die Toxinkonzentration im Medium erhöht werden, am meisten Enterotoxin wurde nach dem Zusatz von 1 % Hefeextrakt allein gebildet (Tab. 19).

Eine Erhöhung der Nährbodenmenge von 200 auf 400 ml führte mit einer Synthese von 1,1 µg SED/ml gegenüber den unter gleichen Bedingungen in 200 ml Nährboden gebildeten 1,8 µg SED/ml zwar zu einem Abfall der Toxinkonzentration, der Toxinertrag konnte jedoch gesteigert werden.

In den 50 ml Kulturflüssigkeit der "sac-culture" wurden 0,23 mg SED (4,6 µg/ml unverdünnte Kulturflüssigkeit) gebildet.

Tab. 18: Einfluß des Anfangs-pH-Wertes des Nährmediums aus C/ELP und C/ESX mit Zusatz von Thiamin und Niacin und der Bebrütungstemperatur auf die Bildung von SED; Bebrütung über 24 h.

| Anfangs-pH-Wert<br>des Nährmediums | SED (µg/ml)                    |        |
|------------------------------------|--------------------------------|--------|
|                                    | Bebrütungstemperatur<br>37 ° C | 40 ° C |
| 6,6                                | 0,84                           | 0,84   |
| 6,8                                | 0,98                           | 0,84   |
| 7,0                                | 0,90                           | 0,94   |
| 7,2                                | 1,06                           | 0,90   |
| 7,4                                | 1,03                           | 0,76   |
| 7,6                                | 0,90                           | 1,16   |

Tab. 19: Einfluß verschiedener Zusätze zum Basalmedium (C/ELP und C/ESX) auf die Bildung von SED; Bebrütung 24 h bei 37 ° C.

| Z u s a t z                                            | SED (µg/ml) |
|--------------------------------------------------------|-------------|
| 0,001 % Niacin / 0,00005 % Thiamin<br>(Kontrolle)      | 0,84        |
| 0,001 % Niacin / 0,00005 % Thiamin/<br>1 % Hefeextrakt | 1,36        |
| 1 % Hefeextrakt                                        | 1,58        |

## **3.2 Reinigung von SED**

### **3.2.1 Material**

SED für die Reinigungsversuche wurde unter Kultivierung von *S. aureus* 1151m im Medium aus 3 % Pepton C/ELP (Serva), 3 % Pepton C/ESX (Serva) und 1 % Hefeextrakt, pH 7,2, und alternativ mit der "sac-culture"-Technik produziert. Für die Produktion von SED im Peptonmedium wurden 400 ml-Portionen des Mediums mit 2,5 % (v/v) der im gleichen Medium hergestellten dritten Vorkultur von *S. aureus* 1151m (s. Abschnitt 3.1.2.3.1) beimpft und 48 h im Schüttelbrutschrank bei 37° C und 275 U/min bebrütet. Anschließend wurden die Kulturen 20 min bei 10.000 U/min und 4° C zentrifugiert. Die Gewinnung von SED mit dem "sac-culture"-Verfahren erfolgte wie unter 3.1.2.4 beschrieben.

Bei der Reinigung von SED wurden folgende Reagenzien und Geräte verwendet: Amberlite-CG-50 (Serva), Carboxymethylcellulose CM 52 (Whatman), Sephadex G-75 (Pharmacia), Polybufferaustauscher PBE 94 (Pharmacia); Pharmalyte 6,5 - 9 (Pharmacia), zwei Proteinsäulen I-125 (Waters GmbH), Spektralphotometer 25 (Beckman Instruments), Leitfähigkeitsmeßgerät mit Leitfähigkeits-Eintauchmeßzelle (WTW), Durchfluß-pH-Elektrode (Pharmacia), Hochleistungs-Flüssigkeitschromatograph (Waters GmbH); Vakuum-Rotations-Verdampfer (Büchi).

In den Gel-Diffusionstests verwendetes Referenztoxin und Anti-SED-Serum stammten entweder von der Fa. Serva oder waren uns freundlicherweise von Prof. M.S. Bergdoll vom Food Research Institute, Madison, Wis. (USA), zur Verfügung gestellt worden.

Die isoelektrische Fokussierung und die SDS-Gelelektrophorese erfolgten mit der Apparatur für Flachgel-Fokussierung bzw. Flachgel-Elektrophorese der Fa. LKB. Zur Messung des pH-Gradienten nach der isoelektrischen Fokussierung wurde eine pH-Oberflächen-Elektrode Typ 403-30-LKB (Ingold) verwendet. In der SDS-Gelelektrophorese lief jeweils ein niedermolekulares Elektrophoreseeichkit der Fa. Pharmacia mit.

### **3.2.2 Methodik**

#### **3.2.2.1 Proteinbestimmung**

In den Fraktionen der ersten beiden Reinigungsschritte erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Methode nach LOWRY et al. (1951), wobei Albumin aus Rinderserum (Serva) als Standard eingesetzt wurde. Die Proteinkonzentration in den durch Chromatofokussierung und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gereinigten Fraktionen wurde photometrisch auf der Basis des von CHANG und BERGDOLL (1979) für SED angegebenen Extinktionskoeffizienten ( $E_{1\%}^{1\text{ cm}}$ ) von 10,6 bei 280 nm ermittelt.

#### **3.2.2.2 Nachweis von SED**

Die Analyse der Reinigungsfractionen auf das Vorhandensein von SED erfolgte mit der Doppelgel-Diffusionsmethode nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975). Dabei wurde das Anti-SED-Serum in einer Verdünnung von 1:20 (Serva) bzw. 1:40 (Bergdoll) verwendet. Das Referenztoxin wurde in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt.

Der quantitative Toxinnachweis wurde mittels der Einfachgel-Diffusionsmethode nach MANCINI et al. (1965) durchgeführt, wobei die Antisera in einer Verdünnung von 1:20 (Serva) bzw. 1:15 (Bergdoll) zum Einsatz kamen. Zur Erstellung einer Eichkurve lief das Referenztoxin auf jeder Platte in Konzentrationen von 0,5 bis 5 µg/ml mit (s. auch 3.1.2.1). In Vorversuchen wurden die Präzipitationsringe von Referenztoxin gleicher Konzentrationen, das im Produktionsmedium, A.dest. oder verschiedenen Puffern gelöst war, ausgemessen. Da sich die Präzipitaturdurchmesser nicht deckten, wurde das Referenztoxin zur Aufstellung von Eichkurven jeweils in dem Lösungsmittel gelöst, in dem das SED zu bestimmen war.

#### **3.2.2.3 Konzentrieren von SED**

Das zwischen den einzelnen Reinigungsschritten erforderliche Konzentrieren SED-haltiger Lösungen erfolgte mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit Kühlfalle.

### 3.2.2.4 Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand

SED wurde durch Adsorption an Carboxymethylcellulose CM 52 oder - nach CHANG und BERGDOLL (1979) - durch Adsorption an Amberlite CG-50 I aus dem Kulturüberstand gewonnen.

#### 3.2.2.4.1 Batchverfahren mit Carboxymethylcellulose CM 52

Ca. 4,4 l Überstand der im Medium aus 3 % C/ELP, 3 % C/ESX und 1 % Hefeextrakt, pH 7,2, gewachsenen Kulturen (1 µg SED/ml) wurden mit A.dest. 1:4 verdünnt und mit 1 N HCl auf pH 5,5 eingestellt. 1000 g Carboxymethylcellulose CM 52 wurden mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 5,5, äquilibriert. Die äquilibrierte Cellulose wurde der verdünnten Kulturflüssigkeit zugesetzt und das Gemisch 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Nach Sedimentation der Carboxymethylcellulose wurde der Überstand dekantiert, die Cellulose in eine Säule (7,0 x 44,5 cm) gepackt und bei 4° C mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 5,5, gewaschen, bis die Extinktion ( $E_{280 \text{ nm}}^{1 \text{ cm}}$ ) unter 0,02 lag. Die Desorption von SED erfolgte mit 0,3 M NaCl in 0,07 M Phosphatpuffer, pH 6,8, bei einer Durchflußrate von 200 ml/h. Die Transmission des Eluats wurde kontinuierlich bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet und das Eluat fraktioniert (11,4 ml/Fraktion).

Für die Adsorption des SED aus ca. 1.200 ml "sac-culture"-Flüssigkeit (4,6 µg SED/ml) wurden lediglich 600 g äquilibrierte Carboxymethylcellulose eingesetzt und der Überstand der Kulturen wurde mit A.dest. verdünnt, bis eine Leitfähigkeit von  $< 6 \times 10^{-3} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$  erreicht war. Alle anderen Bedingungen blieben unverändert.

#### 3.2.2.4.2 Batchverfahren mit Amberlite CG-50 I

Ca. 4,4 l Überstand der im Medium, bestehend aus 3 % C/ELP, 3 % C/ESX und 1 % Hefe, pH 7,2, hergestellten Kulturen (1 µg SED/ml) wurden mit A. dest. 1:4,5 verdünnt und mit 6 N HCl auf pH 5,5 eingestellt. 60 g Amberlite CG-50 I wurden mit 0,02 M Phosphatpuffer, pH 5,6, äquilibriert. Das äquilibrierte Amberlite wurde der Kulturflüssigkeit zugesetzt und das Gemisch 1 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Sedimentieren des Amberlite wurde der Überstand dekantiert und die Austauschermatrix in eine Säule (7,5 x 30 cm)

gepackt und mit A.dest. gewaschen, bis die bei 280 nm gemessene Transmissionsrate des Eluats über 80 % lag. Die Desorption von SED erfolgte mit 0,5 M NaCl in 0,5 M Phosphatpuffer pH 6,2, bei einer Durchflußrate von 180 ml/h. Die Transmission des Eluats wurde kontinuierlich bei 280 nm gemessen und aufgezeichnet und das Eluat in Fraktionen (15 ml/Fraktion) unterteilt.

### 3.2.2.5 Entsalzen mittels Gelfiltration

Sephadex G-50 fine wurde in A.dest. gequollen, entgast, in eine Säule (3,5 x 100 cm) gefüllt und gegen A.dest. äquilibriert. Zum Entsalzen wurden 200 ml des an Carboxymethylcellulose aus dem Kulturüberstand abgetrennten SED mit einem Proteingehalt von 3,6 - 5 mg/ml auf die Gelmatrix aufgebracht und bei einer Fließgeschwindigkeit von 100 ml/h mit A.dest. eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen (5,7 ml/Fraktion) unterteilt und deren Leitfähigkeit bestimmt.

### 3.2.2.6 Chromatofokussierung

Der dritte Reinigungsschritt erfolgte mit Hilfe der Chromatofokussierung (CF) in Anlehnung an ENDE et al. (1983).

Zur Herstellung der Gelmatrix für die CF wurde Polybufferaustauscher PBE 94 in 0,025 M Äthanolamin, pH 9,2 (Startpuffer), aufgenommen, entgast und bei einer Durchflußrate von 314 ml/h in eine Säule gepackt. Anschließend wurde die gepackte Gelmatrix mit in Startpuffer gequollenem und entgastem Sephadex G-25 Coarse überschichtet und mit 10 bis 15 Bettvolumina Startpuffer äquilibriert.

Die Probe (160 - 220 mg Protein in 14 ml) wurde auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und die Leitfähigkeit überprüft. Da sich zu hohe Salzkonzentrationen störend auf den pH-Gradienten auswirken, wurde eine Leitfähigkeit von  $2 \times 10^{-3} \Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$  nicht überschritten.

Pharmalyte, pH 6,5 - 9, wurden mit A.dest. 1:45 verdünnt und mit 1 N HCl auf pH 6,5 eingestellt. Um besonders proteinschonend zu verfahren und SED keinen zu großen pH-Unterschieden auszusetzen, wurden vor Applikation der Probe 5 ml Pharmalyte, pH 6,5, auf die Säule verbracht. Anschließend wurde

die Probe mit Pharmalyten, pH 6,5, bei einer Durchflußrate von 20 ml/h in Fraktionen von 2,85 ml eluiert und die Extinktion ( $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ ) und das pH des Eluats kontinuierlich gemessen. Nachdem das Eluat pH 7,0 erreicht hatte, wurde die Ausbildung des pH-Gradienten gestoppt und die Elution mit 1 M NaCl fortgesetzt.

Der gesamte Chromatofokussierungsschritt wurde bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Abtrennung der Pharmalyte erfolgte mittels Gelfiltration an Sephadex G-75. Sephadex G-75 wurde in eine Säule (1,6 x 95 cm) gepackt und mit 0,1 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,1, äquilibriert. Die SED-Präparate (3-17 mg Protein) wurden auf die Matrix aufgetragen und mit 0,1 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,1, bei einer Durchflußrate von 10 ml/h eluiert. Da Pharmalyte bei 280 nm nur geringgradig absorbieren, wurde die Extinktion individueller Fraktionen (2,85 ml/Fraktion) sowohl bei 280 nm als auch bei 206 nm gemessen.

### 3.2.2.7 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Dieser Reinigungsschritt wurde mittels eines Waters-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographen in zwei Proteinsäulen (I-125; Säule 0,78 x 30 cm) durchgeführt. Die Proben (0,5 - 1,5 mg Protein) wurden mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,0, bei einer Durchflußrate von 0,9 ml/min eluiert. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Extinktionsmessung bei 280 nm.

### 3.2.2.8 Analyse gereinigter SED-Präparate

Die Analyse gereinigter SED-Präparate erfolgte in der isoelektrischen Fokussierung und in der SDS-Gelelektrophorese. Da sich die Anwesenheit von Salz bei beiden Verfahren störend auswirkt, wurden zu untersuchende Fraktionen mit hohem Salzgehalt vorher an Sephadex G-50 (1,6 x 54 cm) mit A. dest. bei einer Durchflußrate von 20 ml/h entsalzt.

### 3.2.2.8.1 Isoelektrische Fokussierung

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde in Form der Ultradünnschicht-isoelektrischen Fokussierung in Polyacrylamidgelen (GÖRG et al., 1978; 1979a; 1979b; 1980; 1981) mit Ampholine-pH-Gradienten von pH 3,5 - 9,5 durchgeführt.

Die Herstellung der 0,36 mm starken Gele und der Elektrodenlösungen erfolgte nach einer Vorschrift von LKB (LKB-SD RE 001). Die Proben wurden mit Glasfaser-Probenaufgabestücken aufgetragen. Die Aufgabestücke wurden auf die Geloberfläche gelegt, je 25 µl Probe (0,2 - 1 mg Protein/ml) aufpipettiert und - nachdem die Proben in das Gel gewandert waren - wieder entfernt. Vor der Probenaufgabe wurde 15 min bei 4° C, 500 V, 250 mA und 20 W vorfokussiert. Die Fokussierung erfolgte bei 4° C, 2000 V, 250 mA und 20 W und dauerte 90 min. Unmittelbar nach der Fokussierung wurde der pH-Gradient bei 4° C entlang einer Linie zwischen Anode und Kathode mit einer pH-Oberflächen-Elektrode gemessen. Die Visualisierungsschritte wurden nach den Empfehlungen von LKB (LKB-SD RE 001) durchgeführt und anschließend die pI-Werte der einzelnen Probenkomponenten mit Hilfe des gemessenen pH-Gradienten bestimmt.

### 3.2.2.8.2 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Gelelektrophorese wurde in horizontalen, ultradünnen Polyacrylamidgelelen (SDS-PAGE) mit einem linearen Porengradienten (T = 7,5 - 22,5 %, C = 3 %) durchgeführt (GÖRG et al., 1980; 1981; 1982).

Herstellung der Gele, Durchführung der Elektrophorese und Visualisierung der Proteinbanden erfolgten nach einer LKB-Vorschrift (LKB-SD RE 003), abweichend war allein die Probenvorbereitung. Die Proben (0,5 - 1,5 mg Protein/ml) wurden im Verhältnis 9:1 mit einer jeweils frisch hergestellten 0,25%igen wäßrigen Lösung von Bromphenolblau versetzt, die in 100 µl 10 mg SDS und 20 mg Mercaptoäthanol enthält. Es wurden jeweils 5 µl Probe in die Gelwannen einpipettiert. Zur Molekulargewichtsbestimmung lief in jeder Elektrophorese ein niedermolekulares Elektrophoreseeichkit mit.

### 3.2.3 Ergebnisse

#### 3.2.3.1 Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand

SED wurde durch Adsorption an Carboxymethylcellulose aus dem Kulturüberstand gewonnen, die Austauschermatrix in eine Säule gepackt und das SED eluiert.

Die Elution des aus dem Überstand der Peptonmediumkulturen an CM-Cellulose-adsorbierten SED erfolgte in Fraktion A, deren Volumen 9 % des Kulturüberstand-Ausgangsvolumens betrug (Abb. 1). In Fraktion A wurde 1 g Protein gefunden. SED aus "sac-cultures" wurde gemeinsam mit allen anderen aus dem Kulturüberstand adsorbierten Proteinen in einer Fraktion von der Carboxymethylcellulose eluiert (Abb. 2). Das Volumen dieser Fraktion machte 56 % des Kultur-Ausgangsvolumens aus und der Proteingehalt lag bei 726 mg.

Die Wiederfindungsrate des Toxins nach der Anreicherung an Carboxymethylcellulose betrug jeweils 70 %. Damit konnte das in den Peptonmediumkulturen gebildete SED um den Faktor 70 und SED aus "sac-cultures" um den Faktor 32 angereichert werden.

In einem weiteren Versuch war in Peptonmediumkulturen gebildetes SED an Amberlite CG-50 I adsorbiert worden. Das in Abb. 3 wiedergegebene Elutionsdiagramm zeigt eine Fraktion, die durchgehend serologische Aktivität aufwies und deren Volumen 54 % des Kulturüberstand-Ausgangsvolumens betrug. In der Fraktion wurden 2,6 g Protein und 80 % des eingesetzten Toxins gefunden, hieraus ergibt sich eine 31fache Anreicherung des SED.

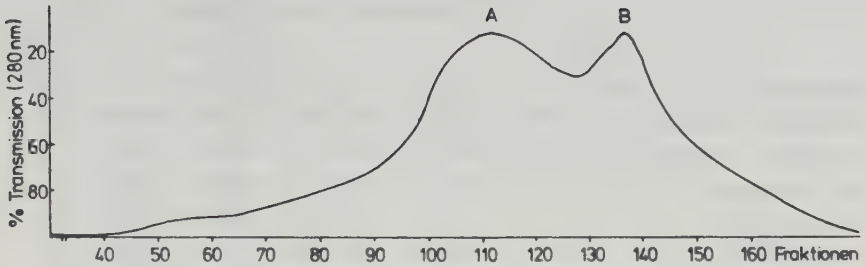


Abbildung 1: Elution des in Peptonmedium-Kulturen gebildeten SED von der Carboxymethylcellulose mit 0,3 M NaCl in 0,07 M Phosphatpuffer, pH 6,8; Durchflußrate 200 ml/h  
Fraktionsvolumen 11,4 ml

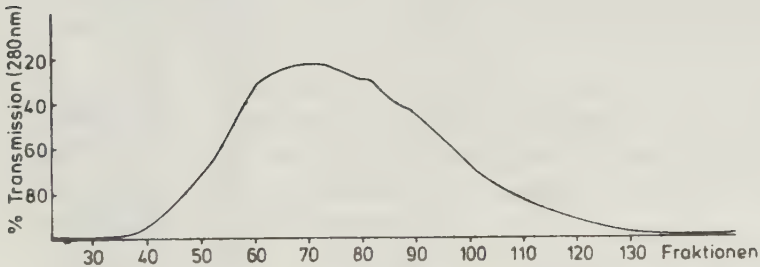
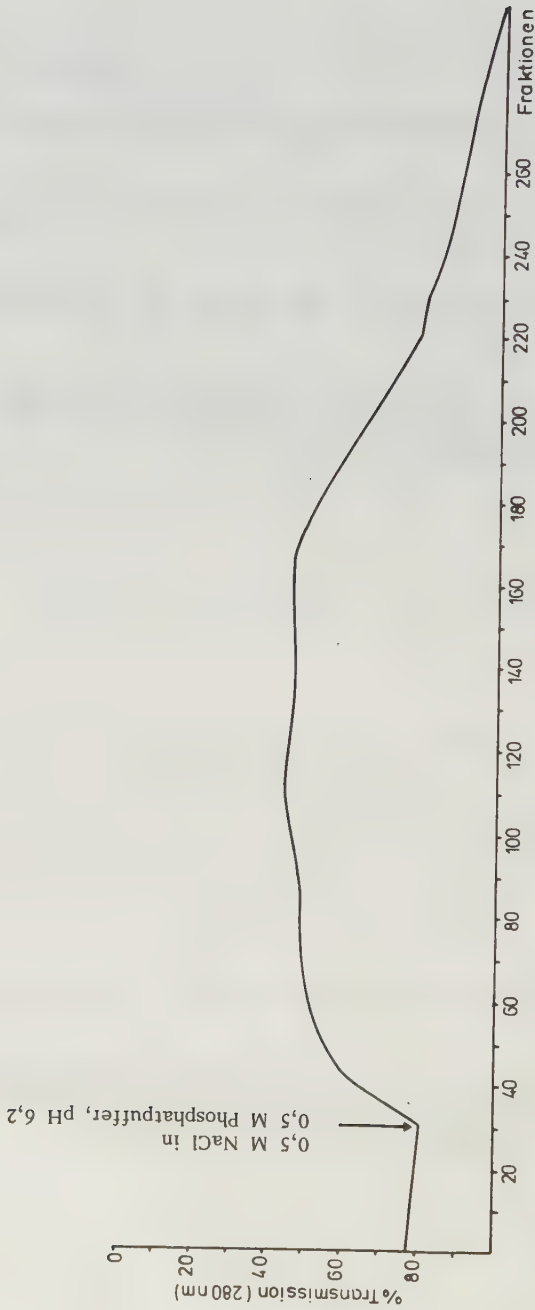


Abbildung 2: Elution des in "sac-cultures" gebildeten SED von der Carboxymethylcellulose mit 0,3 M NaCl in 0,07 M Phosphatpuffer, pH 6,8; Durchflußrate 200 ml  
Fraktionsvolumen 11,4 ml



**Abbildung 3:** Elution des SED von Amberlite CG-50 I mit 0,5 M NaCl in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,2;  
Durchflußrate 180 ml/h  
Fraktionsvolumen 15 ml

### 3.2.3.2 Entsalzen mittels Gelfiltration

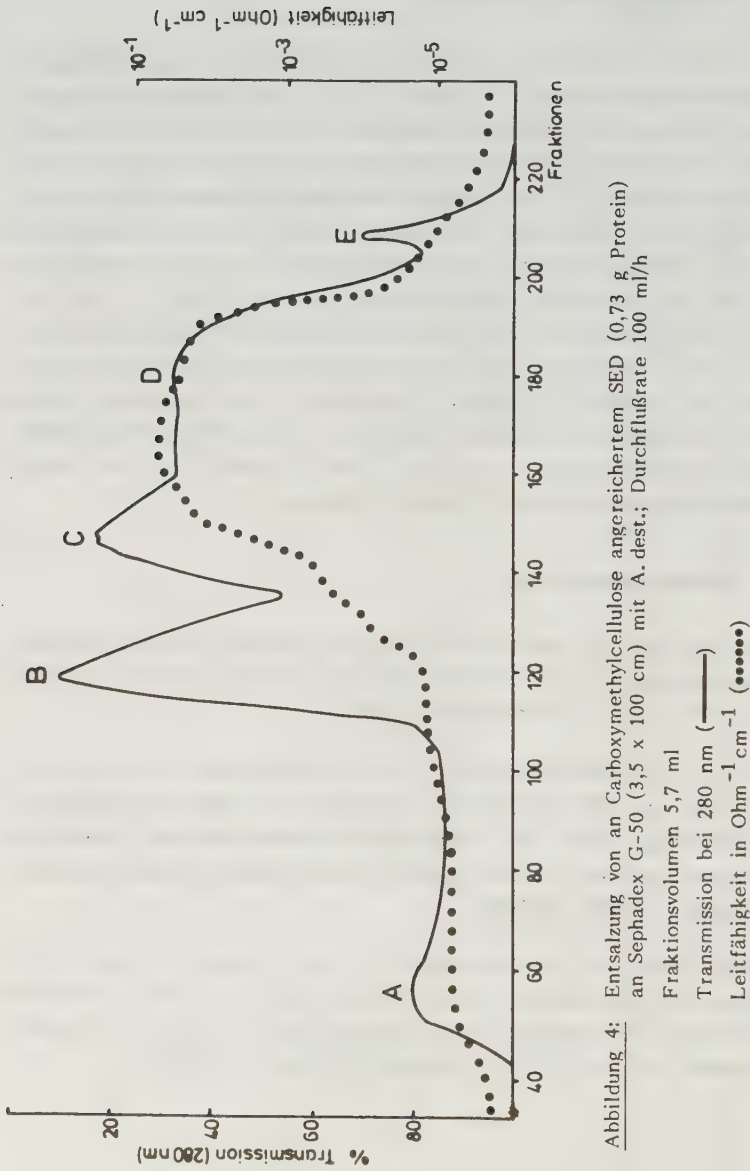
Das an Carboxymethylcellulose angereicherte SED wurde mittels Gelfiltration an Sephadex G-50 (3,5 x 100 cm) entsalzt. In Abb. 4 ist ein typisches Elutionsdiagramm wiedergegeben. Fraktion B enthielt 75 % und Fraktion C weniger als 10 % des zur Entsalzung eingesetzten SED. Die in Fraktion B gemessenen Leitfähigkeiten von  $< 2 \times 10^{-4} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$  spiegeln eine niedrige Salzkonzentration wider, der Hauptteil des Salzes wurde in Fraktion C und D eluiert (Leitfähigkeiten bis  $7 \times 10^{-2} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$ ). Neben der Entsalzung gestattete die Gelfiltration an Sephadex G-50 die Abtrennung kontaminierender Proteine von SED. In den Fraktionen C und D wurden mit dem Salz niedermolekulare Proteine und in Fraktion A Proteine mit Molgewichten größer 30.000 Dalton (Ausschlußgrenze von Sephadex G-50) eluiert. In Fraktion B wurden 22 % des eingesetzten Proteins gefunden. Angesichts des steigenden Salzgehaltes wurden SED-haltige Fraktionen mit einer Leitfähigkeit von  $> 2 \times 10^{-4} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$  verworfen und für weitere Reinigungsschritte ausschließlich Fraktion B eingesetzt.

### 3.2.3.3 Chromatofokussierung

Die Weiterreinigung der entsalzten SED-Präparate erfolgte mittels Chromatofokussierung in einem pH-Bereich von 9,2 bis 7,0, wobei auf der Säule ein Gradient von pH 8,0 bis pH 7,0 ausgebildet wurde.

Abb. 5a zeigt ein Elutionsdiagramm der Chromatofokussierung. Der Hauptanteil von SED wurde bei pH 7,35 (Fraktion F) eluiert, aber auch die Fraktionen C (pI 8,0), E (pI 7,75) und G (pI 7,15) wiesen SED-Spezifität auf. Zwischen den Toxinfraktionen und mit 1 M NaCl wurden Proteine eluiert, die zu vernachlässigende Mengen an SED enthielten.

Während die Elution der Toxinfraktionen C, E und F immer bei dem gleichen pH erfolgte, verschob sich der pI von Fraktion G in einem Teil der Versuche von 7,15 nach 7,25. Dadurch wurden Fraktion F und G nicht mehr aufgelöst und gemeinsam in einer Fraktion (Fraktion F/G) eluiert (Abb. 5b).



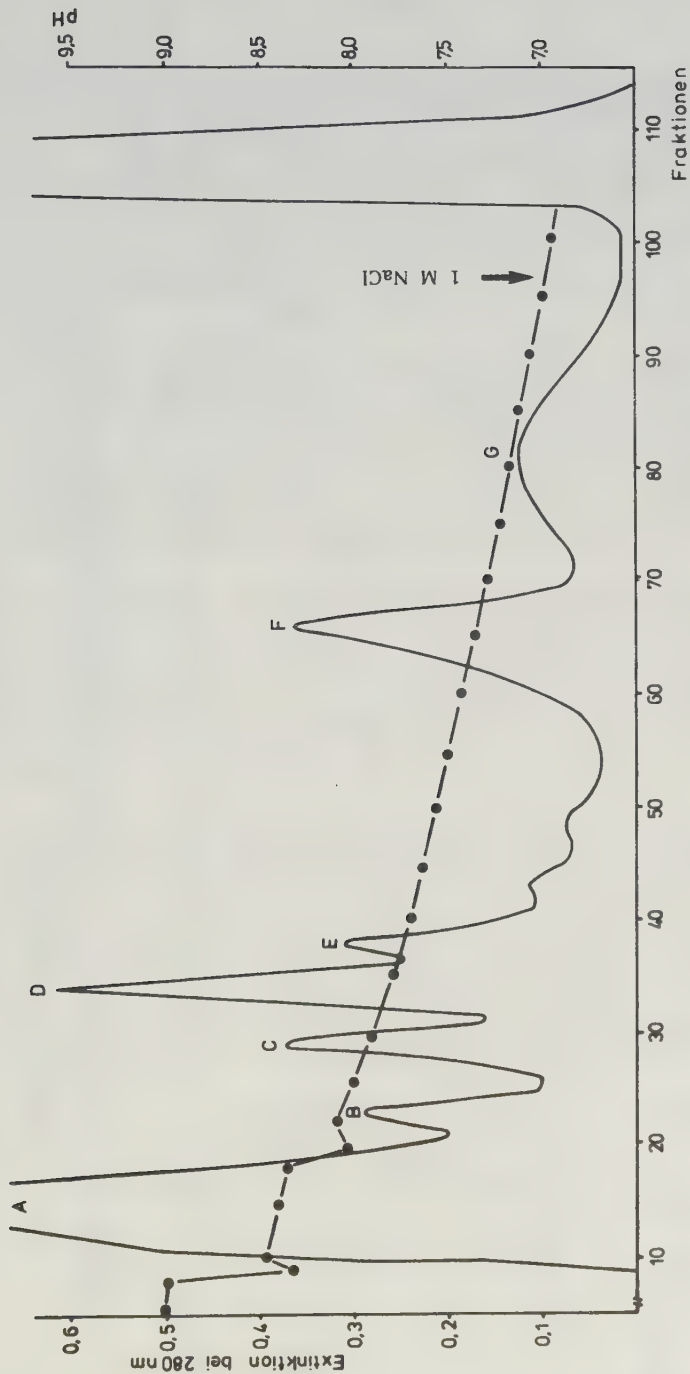


Abbildung 5a: Elutionsdiagramm der Chromatofokussierung von SED. Das entsalzte SED-Präparat (160 - 220 mg Protein) wurde auf die Polybufferaustauschersäule (1 x 40 cm) aufgetragen und mit Pharmalyten, pH 6,5, in Fraktionen von 2,85 ml bei einer Durchflußrate von 20 ml/h eluiert;  
Extinktion bei 280 nm (—); pH-Gradient (●—●)

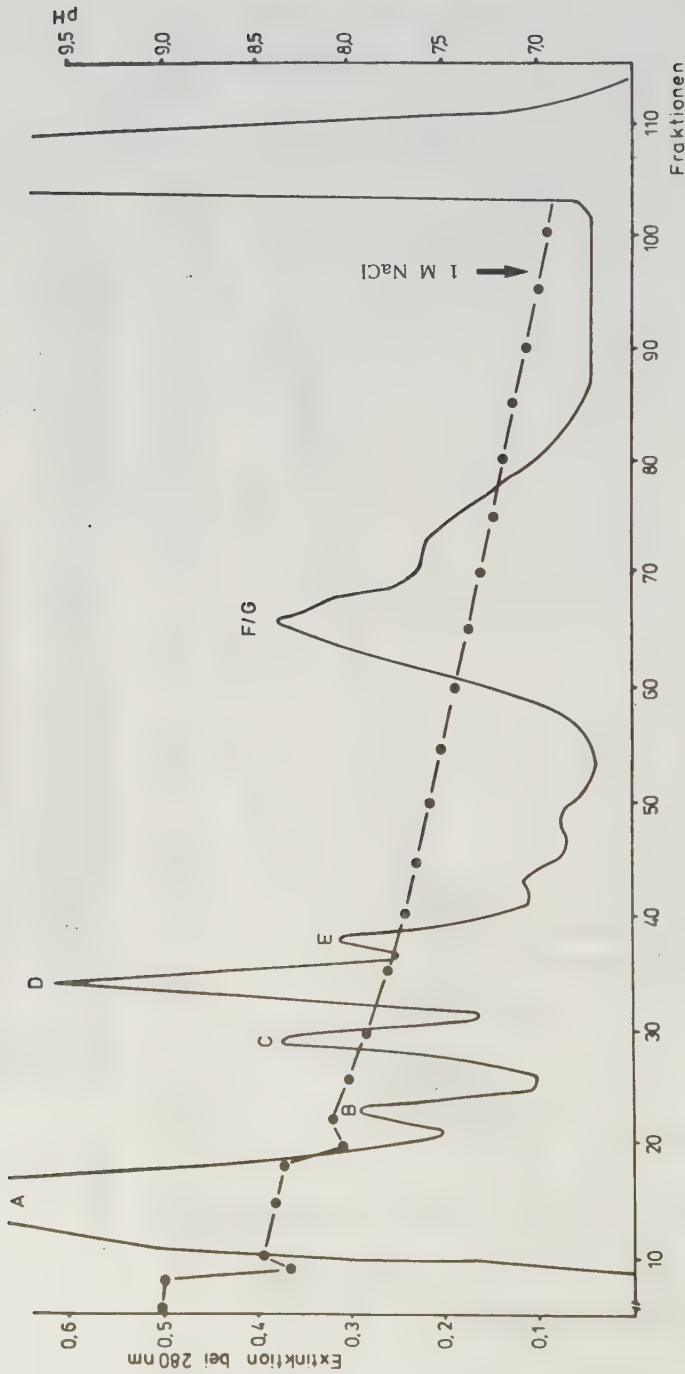


Abbildung 5b: Elutionsdiagramm der Chromatofokussierung von SED. Das entsalzte SED-Präparat (160–220 mg Protein) wurde auf die Polybufferaustauschersäule (1 x 40 cm) aufgetragen und mit Pharmalyten, pH 6,5, in Fraktionen von 2,85 ml bei einer Durchflußrate von 20 ml/h eluiert;

Extinktion bei 280 nm (—●—); pH-Gradient (---●---)

Zur vergleichenden Untersuchung der durch CF gereinigten Fraktionen C, E, F, G und F/G diente die isoelektrische Fokussierung. Dabei wurden die Fraktionen C, E und F in einer Proteinkonzentration von 0,6 mg/ml und Fraktion F/G in einer Konzentration von 0,8 mg/ml eingesetzt. Fraktion G konnte bei einer Ausgangskonzentration von 0,02 mg/ml nur in einer Konzentration von 0,2 mg/ml untersucht werden, da mehr als zehnfach konzentrierte CF-Fractionen aufgrund ihres hohen Pharmalytgehaltes in der IEF eine Verzerrung des pH-Gradienten bewirkten.

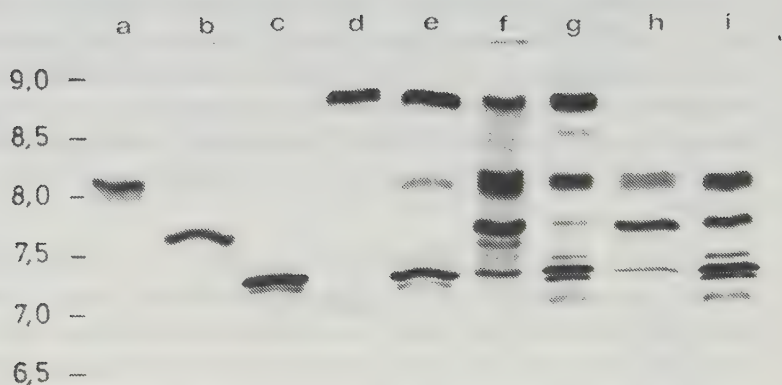
Die Fraktionen C und E wiesen ihre Hauptkomponenten in der IEF bei pH 8,1 bzw. pH 7,8 auf. Spuren der pl 8,1-Komponente waren auch in Fraktion E enthalten, und Fraktion C ließ geringe Anteile der pl 7,8-Komponente erkennen. Gemeinsame schwächere Komponenten von Fraktion C und E lagen bei pH 9,3, pH 8,8 und pH 7,7. Fraktion C wies zusätzlich schwache Komponenten bei pH 8,7, pH 8,45, pH 8,35 und pH 7,6 auf (Abb. 6, Probe a und b).

Die Hauptkomponente von Fraktion F, die in geringen Anteilen bereits in Fraktion E enthalten war, fokussierte sich bei pH 7,4 und eine weitere stärkere Komponente bei pH 7,35. Außerdem ließ Fraktion F Spuren der Hauptkomponenten von Fraktion C und E und weitere schwache Komponenten bei pH 7,25, pH 7,55 und - gemeinsam mit Fraktion C und E - bei pH 8,8 erkennen (Abb. 6, Probe c).

Die bei 4° C in der IEF gefundenen pl-Werte der Hauptkomponenten von Fraktion C, E und F wiesen gute Übereinstimmung mit den in der CF bei Raumtemperatur ermittelten pl-Werten dieser Fraktionen auf. Bei Fraktion G zeigte sich hier jedoch eine deutliche Abweichung, und während in der CF ein pl von 7,15 ermittelt wurde, fokussierte sich die Hauptkomponente in der IEF bei pH 8,8. Neben der pl 8,8-Hauptkomponente zeigte Fraktion G in der IEF geringe Anteile der pl 7,4 und pl 7,25-Komponenten von Fraktion F und weitere schwache Komponenten bei pH 8,55 und pH 9,0 (Abb. 6, Probe d).

Fraktion F/G wies erwartungsgemäß alle in Fraktion F und G gefundenen Komponenten auf, und für die beiden Hauptkomponenten wurden pl-Werte von 8,8 (s. Fraktion G) und 7,4 (s. Fraktion F) ermittelt (Abb. 6, Probe e).

Die Fraktionen F und G - soweit in der CF getrennt - und die Fraktionen C und E wurden jeweils vereinigt (Fraktion C/E bzw. F/G) und nacheinander zur



**Abbildung 6:** Isoelektrische Fokussierung von SED-Fractionen, gewonnen nach Chromatofokussierung (Fraktion C, E, F, G und F/G), Abtrennung der Pharmalyte mittels Gelfiltration an Sephadex G-75 (Fraktion C/E' und F/G') und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Fraktion Ia und IIa).

Isoelektrische Fokussierung in ultradünnem Polyacrylamidgel mit Ampholinen (pH 3,5 - 9,5) bei 4° C. Der pH-Wert wurde bei 4° C mit einer pH-Oberflächen-Elektrode bestimmt.

- a) SED Fraktion C (0,6 mg/ml)
- b) SED Fraktion E (0,6 mg/ml)
- c) SED Fraktion F (0,6 mg/ml)
- d) SED Fraktion G (0,2 mg/ml)
- e) SED Fraktion F/G (0,8 mg/ml)
- f) SED Fraktion C/E' (1 mg/ml)
- g) SED Fraktion F/G' (1 mg/ml)
- h) SED Fraktion Ia (1 mg/ml)
- i) SED Fraktion IIa (1 mg/ml)

Abtrennung der Pharmalyte eingesetzt. Wie in Abb. 7 dargestellt, konnten die Pharmalyte durch Gelfiltration an Sephadex G-75 quantitativ abgetrennt werden. Die SED-Spezifität beschränkte sich auf die erste Fraktion (Fraktion C/E' bzw. F/G'), während die zweite Fraktion frei von SED war.

Nach Abtrennung der Pharmalyte wurden die Toxinfraktionen erneut in der IEF und zusätzlich in der SDS-PAGE untersucht.

Die Fraktion C/E' wies in der IEF alle in Fraktion C und E gefundenen Komponenten auf, wobei die pl 7,6-Komponente aus Fraktion C in zwei dicht nebeneinanderliegende Komponenten aufgespalten war. Zusätzliche schwache Banden lagen bei pH 9,1, pH 8,0, pH 7,25 und pH 6,85 (Abb. 6, Probe f).

In der SDS-PAGE zeigte Fraktion C/E' ihre Hauptbande bei 28.000 Dalton. Daneben waren fünf schwächere Banden (42.000 Dalton, 37.000 Dalton, 35.000 Dalton, 20.100 Dalton, 14.400 Dalton) zu erkennen (Abb. 8, Probe a).

Fraktion F/G' wies in der SDS-PAGE zwei etwa gleichstarke Banden bei 28.000 und 37.000 Dalton und eine schwächere Bande bei 14.400 Dalton auf (Abb. 8, Probe c).

In der IEF zeigte Fraktion F/G' alle in Fraktion F und G gefundenen Komponenten. Außerdem ließ die Fraktion Spuren der pl 6,85- und pl 7,7-Komponenten erkennen (Abb. 6, Probe g).

In den Toxinfraktionen C/E' und F/G' wurden 63 % des zur Chromatofokussierung eingesetzten SED wiedergefunden, ca. 13 % in Fraktion C/E' und ca. 50 % in Fraktion F/G'. Der Reinheitsgrad des Toxins in Fraktion C/E' betrug ca. 20 % und der des Toxins in Fraktion F/G' ca. 35 %. Diese Angaben können jedoch nur als Anhaltspunkte dienen, da bei der Chromatofokussierung verschiedener SED-Chargen sowohl die Verteilung des wiedergefundenen SED auf die Toxinfraktionen als auch der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen variierten.

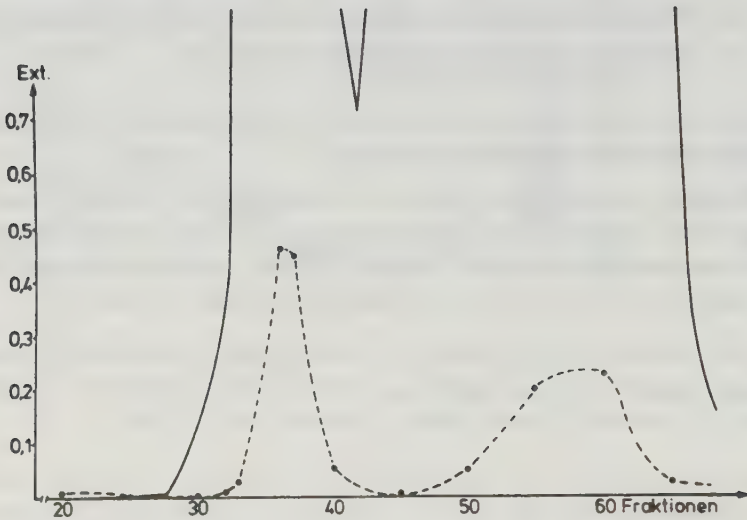


Abbildung 7: Gelfiltration an Sephadex G-75 (1,6 x 95 cm) zur Abtrennung der Pharmalyte von durch Chromatofokussierung gereinigten SED-Fractionen. Die Elution erfolgte mit 0,1 M NaCl in 0,01 M Phosphatpuffer, pH 7,1, in Fraktionen von 2,85 ml bei einer Durchflußrate von 20 ml/h;  
Extinktion bei 206 nm (—)  
Extinktion bei 280 nm (•---•)

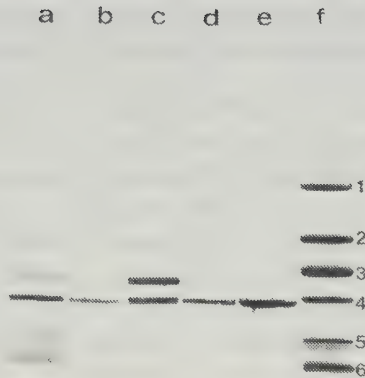


Abbildung 8: SDS-Gelelektrophorese von SED-Fraktionen, gewonnen nach Chromatofokussierung und Abtrennung der Pharmalyte (Fraktion C/E' und F/G') und nach Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (Fraktion Ia und IIa).

SDS-Gelelektrophorese in ultradünnem Polyacrylamidgel mit linearem Porengradienten ( $T = 7,5 - 22,5 \%$ ,  $C = 3 \%$ ).

- a) SED Fraktion C/E' (1 mg/ml)
- b) SED Fraktion Ia (1 mg/ml)
- c) SED Fraktion F/G' (1 mg/ml)
- d) SED Fraktion IIa (0,5 mg/ml)
- e) SED Fraktion IIa (1,5 mg/ml)
- f) Eichproteine mit Molgewicht in Dalton
  - (1) Phosphorylase b, 94.000
  - (2) Rinderserumalbumin, 67.000
  - (3) Eialbumin, 43.000
  - (4) Carboanhydrase, 30.000
  - (5) Sojabohnentrypsininhibitor, 20.100
  - (6)  $\alpha$ -Lactalbumin, 14.400

### 3.2.3.4 Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie

Die SED-Fractionen C/E' und F/G' wurden mittels Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie weitergereinigt. In Abb. 9 ist das Elutionsdiagramm der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Fraktion C/E' wiedergegeben.

Die Elution des Hauptanteils von SED erfolgte bei Retentionszeiten (RT) von 15,2 bis 20,1 (Fraktion Ia), aber auch Fraktion Ib (RT 20,1 - 28,1) wies geringe SED-Spezifität auf. Bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Fraktion F/G' wurde SED in den Fraktionen mit RT von 16,0 - 20,3 (Fraktion IIa) und von 20,3 bis 26,6 (Fraktion IIb) eluiert, wobei Fraktion IIb wiederum nur geringe SED-Spezifität zeigte (Abb. 10). Um abzuklären, ob es sich bei der in den Fraktionen Ib und IIb nachgewiesenen Aktivität von SED um eine weitere Toxinkomponente handelte oder ob lediglich die Trennung zwischen den Fraktionen Ia und Ib bzw. IIa und IIb unvollständig war, wurden die Fraktionen Ib und IIb vereinigt und rechromatographiert. Dabei wurde die Hauptaktivität von SED wiederum in einer Vorfraktion gefunden, die mit RT von 15,8 - 21,2 das nahezu gleiche Retentionsvolumen wie die Fraktionen Ia und IIa aufwies (nicht dokumentiert).

Die Fraktionen Ia und IIa wurden jeweils in der SDS-PAGE und in der IEF untersucht. Fraktion Ia zeigte in der SDS-PAGE eine Hauptbande bei 28.000 Dalton und zwei schwache Banden bei 20.100 und 14.400 Dalton (Abb. 8, Probe h). Das IEF-Muster der Fraktion Ia unterschied sich vom Fokussierungsmuster der Fraktion C/E' durch die fehlenden Komponenten bei pH 8,8, pH 8,7, pH 8,45 und pH 8,35. Außerdem war die pI 8,1-Komponente in zwei unmittelbar nebeneinanderliegende Komponenten aufgespalten (Abb. 6, Probe h).

Fraktion IIa wies bei der Analyse in der SDS-PAGE eine Bande bei 28.000 Dalton auf (Abb. 8, Probe d und e). In der IEF wurden drei Hauptkomponenten bei pH 8,1, pH 7,8 und pH 7,4 unterschieden, und weitere relativ starke Komponenten fokussierten sich bei pH 7,55, pH 7,35 und pH 7,25. Schwache Komponenten lagen bei pH 7,7 und pH 6,85 (Abb. 6, Probe i).

Die Wiederfindungsrate bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie betrug jeweils ca. 74 %. Damit waren in Fraktion Ia ca. 5 % und in Fraktion IIa ca. 20 % des Toxins aus dem Kulturüberstand enthalten. Das Toxin in Fraktion IIa wies - wie die Ergebnisse der SDS-PAGE dokumentieren - einen hohen Grad an Reinheit auf. In Fraktion Ia lag SED 70%iger Reinheit vor.

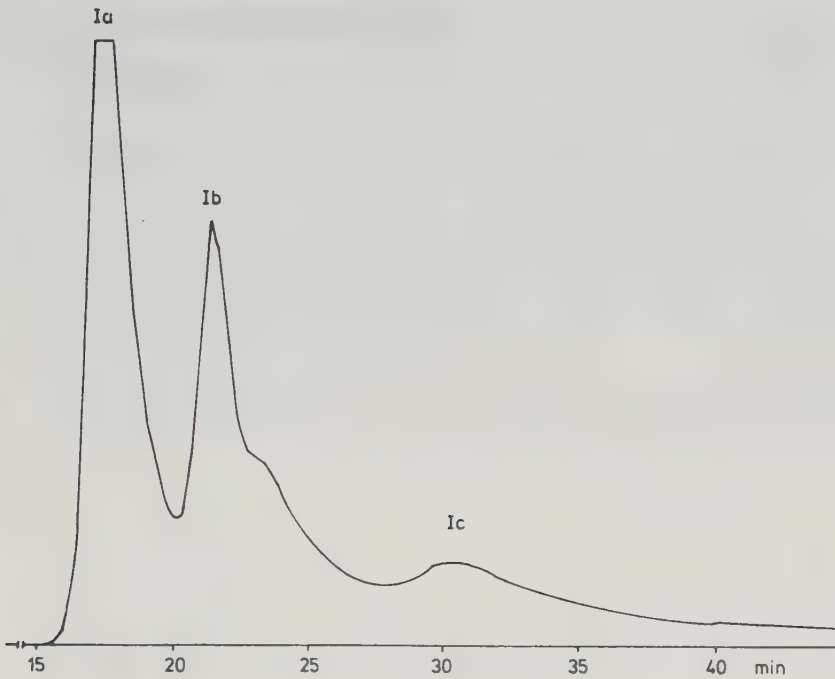


Abbildung 9: Elutionsdiagramm der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von SED-Fraktion C/E'. Nach Abtrennung der Pharmalyte wurde Fraktion C/E' (0,5 mg Protein) auf die Proteinsäulen I-125 (0,78 x 30 cm) aufgetragen und mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,0, bei einer Durchflußrate von 0,9 ml/min eluiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Extinktionsmessung bei 280 nm (0,1 AUFS).

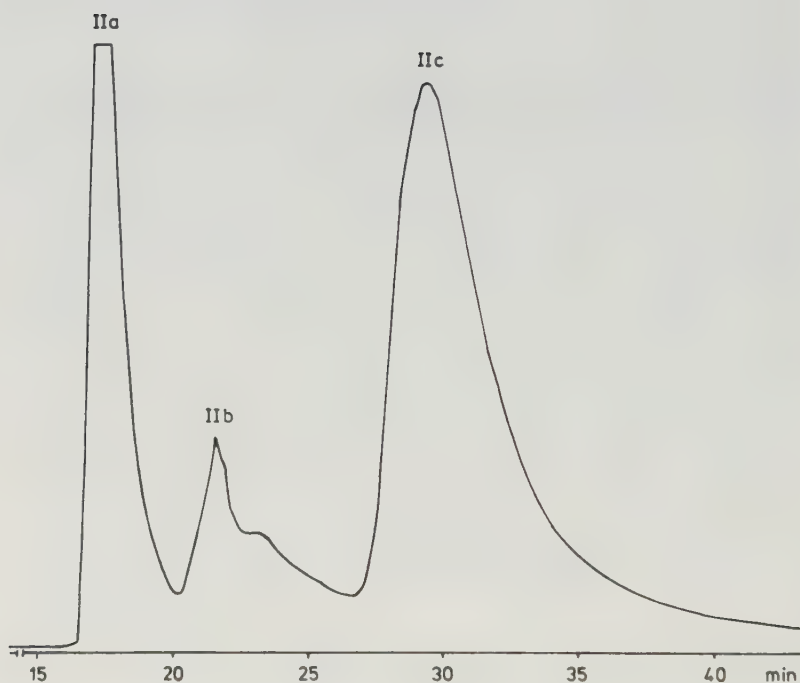


Abbildung 10: Elutionsdiagramm der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von SED-Fraktion F/G'. Nach Abtrennung der Pharmalyte wurde Fraktion F/G' (0,5 mg Protein) auf die Proteinsäulen I-125 (0,78 x 30 cm) aufgetragen und mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_2$  in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,0, bei einer Durchflußrate von 0,9 ml/min eluiert. Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Extinktionsmessung bei 280 nm (0,1 AUFS).

### **3.3 Immunisierungsversuche mit SED**

#### **3.3.1 Material**

Als Antigen diente die an Sephadex G-50 (1,6 x 54 cm) mit A.dest. bei einer Durchflußrate von 20 ml/h entsalzte SED-Fraktion IIa (s. 3.2.3.4).

Zwei Schafe ("Deutsches Merinoschaf") wurden im Alter von neun Monaten in den Versuch genommen und während der Versuchsphase im Stall gehalten. Vor Immunisierungsbeginn waren die Tiere mit negativem Ergebnis auf bereits eventuell erworbene SE-Antikörper untersucht worden.

In der Doppelgel-Diffusionstechnik wurden die SED-Fraktion IIa (s. 3.2.3.4) und SED der Firma Serva sowie Anti-SED-Serum von Prof. Bergdoll verwendet.

#### **3.3.2 Methodik**

##### **3.3.2.1 Immunisierung**

Bei der Immunisierung von Schafen gingen wir in Anlehnung an NOTERMANS (1982) nach folgendem Immunisierungsschema vor: Zunächst wurden 5 µg SED (1 ml) mit 1 ml komplettem Freundschens Adjuvans (Difco) - auf drei Stellen verteilt - intramuskulär appliziert. Im Abstand von jeweils zehn Tagen schlossen sich analoge Applikationen von 10, 20, 40, 100 und 200 µg SED (1 ml) mit je 1 ml inkomplettem Freundschens Adjuvans (Difco) an. Eine Restimulierung der Tiere erfolgte 4, 17 und 21 Wochen nach der Grundimmunisierung mit 200, 300 und 400 µg SED bei Tier 1 und 200, 400 und 500 µg SED bei Tier 2, jeweils emulgiert mit 1 ml inkomplettem Freundschens Adjuvans.

##### **3.3.2.2 Bestimmung präzipitierender Antikörper**

Im Verlauf der Immunisierung wurde eine Woche nach der vierten sowie eine und drei Wochen nach der sechsten Grundimmunisierung und jeweils eine Woche nach den Restimulierungen Blut entnommen. Nach einstündiger Inkubation bei 37° C wurde das Blut über Nacht bei 4° C aufbewahrt und dann abzentrifugiert (20 min bei 3000 U/min und 4° C). Die gewonnenen Sera wurden mit der Doppelgel-Diffusionsmethode nach SOMMERFELD und TERPLAN (1975) un-

tersucht, wobei SED von Serva in einer Konzentration von 5 µg/ml und SED aus eigener Herstellung in einer Konzentration von 13 µg/ml eingesetzt wurden. Das Referenzantiserum wurde in einer Verdünnung von 1:40 verwendet.

### 3.3.3 Ergebnisse

Das Allgemeinbefinden der Tiere während der Immunisierung war ungestört. Abb. 11 zeigt die Immunantwort der zwei Schafe im Verlauf der Immunisierung. Nach der ersten Restimulierung mit 200 µg SED betrug der Anti-SED-Präzipitationstiter bei beiden Tieren lediglich 1:32. Durch zusätzliche Restimulierungen mit 300 und 400 µg SED konnte bei Schaf 1 eine Steigerung der Immunantwort bis zu einem spezifischen Titer von 1:1000 erzielt werden. Der Anti-SED-Titer von Schaf 2 lag jedoch nach zusätzlichen Restimulierungen nur bei 1:60, obwohl im Vergleich zu Schaf 1 höhere Toxindosen (400 und 500 µg SED) appliziert worden waren.

Im Rahmen eines Forschungsauftrags wurde das von Schaf 1 gewonnene Anti-SED-Serum im Institut zunächst durch Ammoniumsulfatfällung gereinigt. Zur Isolierung von IgG aus der Ig-Rohfraktion folgte eine Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Trisacryl M (LKB) mit einem Tris-HCl-Puffergradienten. Das gereinigte IgG wurde mit Meerrettichperoxidase (Sigma) bzw. der lumineszierenden Verbindung ABEI-H (N-(4-Aminobutyl)-N-ethylisoluminolhemisuccinamid; LKB) markiert und ein enzym- sowie ein lumineszenzimmunologisches System für den Nachweis von SED erstellt.

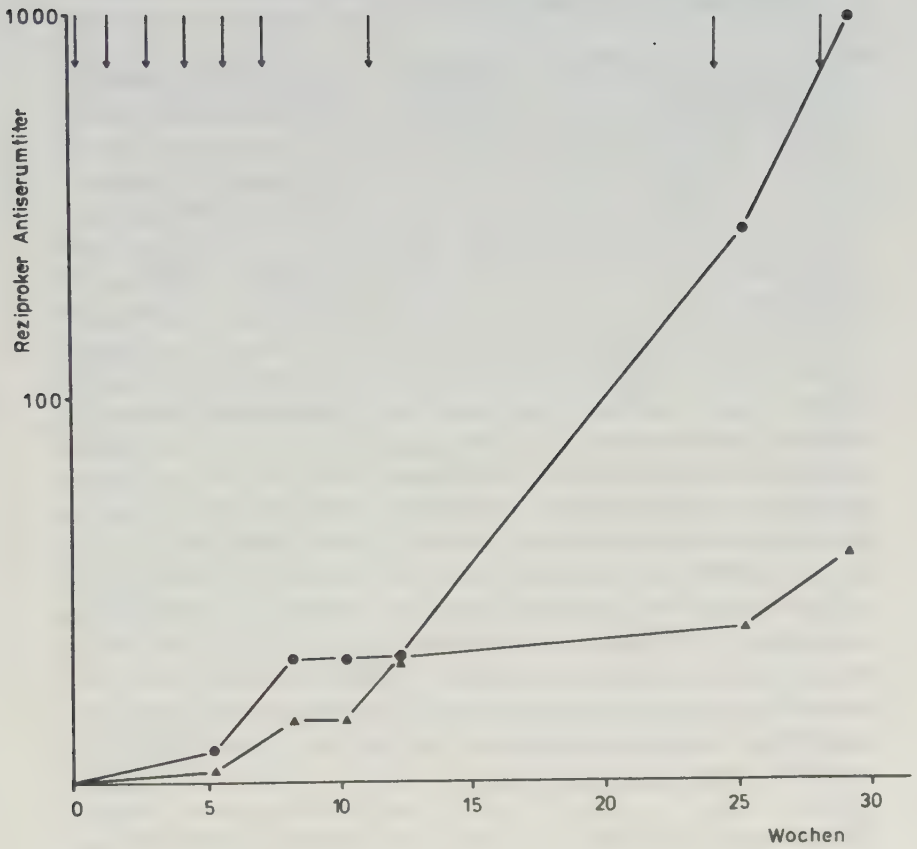


Abbildung 11: Immunantwort von Schafen nach Immunisierung mit SED

● Tier 1;

▲ Tier 2;

↓ Toxinapplikation

#### 4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

*S. aureus* zählt weltweit neben Salmonellen zu den häufigsten bakteriellen Lebensmittelvergiftern. Die als Staphylokokken-Intoxikation bezeichnete Erkrankung wird durch hitzestabile Enterotoxine (SE) hervorgerufen, die von etwa 50 % (NOTERMANS et al., 1984) der Koagulase-positiven Staph. gebildet werden. Die SE werden aufgrund ihrer Reaktion mit spezifischen Antikörpern in verschiedene Typen (bisher bekannt: A, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, D und E) eingeteilt. Der Nachweis der SE ist aus epidemiologischen Gründen wichtig und dient außerdem dazu, die Erfahrungen hinsichtlich der Prophylaxe der Lebensmittelvergiftungen zu erweitern. Für den zuverlässigen serologischen Nachweis sind hochgereinigte Enterotoxine und spezifische Antiseren erforderlich. Diese Reagenzien stehen jedoch nur in beschränktem Umfang zur Verfügung und sind darüber hinaus sehr teuer. Das ist primär darauf zurückzuführen, daß SE, insbesondere die SE-Typen A, D und E, in den Kulturen nur in relativ geringen Mengen synthetisiert werden (s. a. Tab. 9) und aus dem Rohtoxin erst mittels sehr aufwendiger Reinigungsverfahren zu isolieren sind (BERGDOLL, 1967; 1972; 1979). Für Produktion und Reinigung von Enterotoxin sind daher ergiebige Verfahren wünschenswert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, optimale Bedingungen für die Produktion großer Mengen von Enterotoxin D (SED) hinsichtlich Züchtungsverfahren, Nährmedium und anderer Faktoren (z.B. pH-Wert, Schüttelgeschwindigkeit etc.) zu ermitteln sowie SED mit dem Ziel hoher Toxinausbeuten durch Chromatofokussierung zu reinigen.

SED wird nach BERGDOLL (1979) von Staph.-Stämmen in gleichbleibend geringen Mengen synthetisiert. Für die eigenen Untersuchungen standen dafür die *S. aureus*-Stämme 1151m, 472 und 494 (ATCC 23235, Referenzstamm von SED) zur Verfügung.

Bei der Prüfung des SED-Bildungsvermögens dieser Stämme mit dem "sac-culture"-Verfahren nach DONELLY et al. (1967) ergaben sich verhältnismäßig große Unterschiede. So wurden im Kulturüberstand von *S. aureus* 1151m nach 48 h Bebrütung 6,6 µg SED/ml nachgewiesen, während *S. aureus* 494 in dieser Zeit nur 1,6 µg SED/ml bildete und der Stamm 472 Mengen, die mit weniger als 0,5 µg/ml unterhalb der Nachweisgrenze des MANCINI-Tests

lagen. Auch nach einer Inkubationszeit von 24 h, die allerdings zu durchweg schlechteren Ergebnissen führte, erwies sich *S.aureus* 1151m als bester Toxinproduzent. Um den Einfluß verschiedener extrazellulärer Faktoren auf die Produktion von SED zu prüfen, wurden Kulturen dieses Stammes gewählt. In verschiedenen Versuchsreihen mit *S.aureus* 1151m erzielte Ergebnisse waren dabei nicht direkt miteinander vergleichbar, da im Toxinbildungsvermögen des Stammes deutliche Unterschiede festgestellt wurden. BERGDOLL (1979) gibt die Menge des von verschiedenen Kolonien SED-bildender Staph.-Stämme produzierten Toxins jedoch als sehr einheitlich an. Der eigene Nachweis eines schwankenden Toxinbildungsvermögens bei *S.aureus* 1151m beruht möglicherweise darauf, daß für die Erstellung der Eichkurve im MANCINI-Test - mittels derer die Enterotoxinmengen in den verschiedenen Versuchsreihen bestimmt wurden - SED (Serva) unterschiedlicher Chargen verwendet worden war.

*S.aureus* 1151m wurde zunächst nur in flüssigen Nährmedien gezüchtet. Dabei wurden verschiedene flüssige Nährmedien - im Hinblick auf die Fragestellung dieser Arbeit ausschließlich Nährmedien aus niedermolekularen Bestandteilen, die sich leicht von den SE abtrennen lassen - auf ihre Ergiebigkeit in der Produktion von SED geprüft. Alle Medien waren mit einem Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin versehen. Für die Produktion von SED erwies sich unter den nichtkombinierten Medien die Bouillon aus 4 % S/ELB als am besten geeignet, das schlechteste Ergebnis wurde mit dem Medium aus 4 % C/HSB erzielt (Tab. 16). Letzteres bestätigt Angaben von BERGDOLL (1979), wonach säurehydrolysiertes Casein für die Erzielung hoher SE-Konzentrationen des Zusatzes mehrerer für das Wachstum von *S.aureus* essentieller Stoffe (anorganische Salze, Vitamine, Aminosäuren, Magnesiumsulfat, Eisen-III-Citrat; CASMAN, 1958) bedarf (BERGDOLL, 1979). Durch Kombination von jeweils zwei Proteinhydrolysaten konnte die Enterotoxinproduktion meist gesteigert werden, einzige Ausnahme bildete die Kombination aus 3 % C/ELP mit 3 % C/HSB, in der weniger Enterotoxin/ml registriert wurde als im nur aus 4 % C/ELP bestehenden Medium. Die besten Resultate in diesem Versuch wurden mit der Mediumkombination aus 3 % C/ELP und 3 % C/ESX erzielt.

Für die Produktion von SE in Medien aus enzymatisch abgebautem Casein wird die Anreicherung mit Hefeextrakt empfohlen (BERGDOLL, 1979). Daher

wurde geprüft, ob durch Zusatz von 1 % Hefeextrakt zum Medium aus 3 % C/ELP und 3 % C/ESX, zusätzlich zu den Vitaminen oder anstelle der Vitamine, eine Verbesserung der SED-Produktion zu erzielen ist. Gegenüber der nur mit Vitaminen angereicherten Kontrolle ermöglichte der Zusatz von Hefeextrakt jeweils eine deutlich bessere Enterotoxinproduktion. Am meisten SED wurde bei Zusatz von 1 % Hefeextrakt allein gebildet (Tab. 19).

SE kann in Medien mit Anfangs-pH-Werten von 5-8 produziert werden. Die Bebrütung der Kulturen zur Gewinnung von SE erfolgt im allgemeinen bei 37° C, da diese Temperatur nicht nur als optimal für das Wachstum von *S. aureus*, sondern auch für die SE-Produktion angesehen wird (BERGDOLL, 1979). Nach TATINI et al. (1971) erbringen jedoch Inkubationstemperaturen über 37° C höhere Ausbeuten an den Enterotoxinen A-D. Um das optimale Anfangs-pH des Mediums sowie die am besten geeignete Bebrütungstemperatur für die Synthese von SED zu ermitteln, wurde in eigenen Untersuchungen das Nährmedium auf pH-Werte im Bereich von 6,6-7,6 mit Abständen von 0,2 pH eingestellt und das Medium jeder pH-Wert-Stufe jeweils bei 37° C oder bei 40° C bebrütet. Die maximale Enterotoxinbildung wurde im Medium registriert, das auf ein Anfangs-pH von 7,6 eingestellt und bei 40° C bebrütet worden war. Geringfügig weniger Enterotoxin wurde im auf pH 7,2 eingestellten und bei 37° C bebrüteten Medium gefunden. Bei diesen Angaben ist jedoch zu berücksichtigen, daß das Gesamtergebnis des Versuches starke Unregelmäßigkeiten aufwies und sich weder eine klare Tendenz zu pH 7,2 (bei der Bebrütungstemperatur von 37° C) oder 7,6 (bei einer Bebrütungstemperatur von 40° C) als optimalem Anfangs-pH-Wert ablesen ließ, noch sich eine der beiden Bebrütungstemperaturen der anderen eindeutig als überlegen zeigte (Tab. 18). Die Unstimmigkeiten sind wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß der niedrige Enterotoxingehalt der einzelnen Kulturen mit dem MANCINI-Test in diesem Versuch nicht ausreichend genau erfaßt werden konnte. Bei niedrigen Toxinkonzentrationen ist im MANCINI-Test keine zuverlässige Beziehung von Durchmesser der Präzipitate und Toxinkonzentrationen mehr gegeben. Außerdem sind die Präzipitate bei geringen Antigenmengen sehr klein und nicht mehr gut ablesbar.

Vermehrung von Staphylokokken und Bildung von SE können sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen erfolgen, doch sind aerobe Verhältnisse günstiger, zumal dann andere Faktoren, wie pH, Temperatur und

$a_w$ -Wert, von wesentlich geringerer Bedeutung sind (BAIRD-PARKER, 1971; BERGDOLL, 1979). Bei Einsatz flüssiger Medien empfiehlt sich daher eine direkte oder indirekte Belüftung auch der tiefen Schichten des Mediums. Bei der indirekten Belüftung der Medien durch Schütteln kommt es nicht nur auf die Geschwindigkeit der Bewegung an, sondern auch auf die Größe des Gefäßes in bezug zur Menge des Mediums. In eigenen Untersuchungen wurde festgestellt, daß von *S. aureus* 1151m in 2 l-Erlenmeyerkolben mit 200 ml Medium (Einsaatmenge 2,5%) bei einer Schüttelgeschwindigkeit von 275 U/min erheblich größere Enterotoxinmengen produziert werden können als bei 175 U/min (Tab. 17). Bei Erhöhung der Nährbodenmenge von 200 auf 400 ml ging der Enterotoxinertrag/ml zurück. Aufgrund der bei Einsatz von 400 ml Medium zu erzielenden höheren Enterotoxinausbeute pro Erlenmeyerkolben wurde jedoch der größeren Menge der Vorzug gegeben.

Ein Vergleich der Inkubationszeiten von 24, 36 und 48 h ergab, daß durch Verlängerung der Bebrütung von 24 auf 48 h die SED-Produktion gesteigert werden konnte.

Im folgenden wurde SED mit *S. aureus* 1151m in flüssigen Nährmedien unter den Bedingungen produziert, mit denen in den einzelnen Versuchsabschnitten jeweils die höchste Toxinausbeute erreicht worden war (Nährbodenzusammensetzung: 3 % C/ELP, 3 % C/ESX und 1 % Hefeextrakt; Verhältnis von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen: 400 ml Medium in 2 l-Erlenmeyerkolben; Bebrütung: 48 h bei 275 U/min). Nur das Ausgangs-pH des Mediums und die Bebrütungstemperatur wurden anders gewählt (pH 7,2, 37°C), da der entsprechende Versuch kein zuverlässiges Ergebnis erbracht hatte. Die erzielten Toxinausbeuten betrugen 0,7 - 1,3 µg SED/ml Kulturüberstand. MÜLLER (1981) und FEY et al. (1984), die zur Produktion von SED Kulturen des Stammes 1151m in 300 ml-Portionen (in 1 l-Erlenmeyerkolben mit vier Wand-schikanen) eines Mediums aus 3% C/ELP und 3% C/PLB mit Zusatz von 0,001 % Niacin und 0,00005 % Thiamin 72 h bei 37°C und 105 U/min bebrüteten, erreichten Toxinausbeuten von nur 0,4 - 0,6 bzw. 0,5 - 0,8 µg SED/ml Kulturüberstand. Als Erklärung für die niedrige Enterotoxinausbeute von MÜLLER (1981) und FEY et al. (1984) käme die schlechte Sauerstoffversorgung der Staphylokokken in Frage, resultierend aus dem relativ eng gewählten Verhältnis von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen und der niedrigen Geschwindigkeit, mit der die Kulturen geschüttelt wurden. CHANG und BERG-

DOLL (1979) produzierten SED mit Fermenter-Kulturen von *S. aureus* 1151m, die unter Einleitung von 1 l Luft/min pro l Medium (3 % NZ Amine NAK, 3 % PHP, 0,001 % Niacin, 0,00005 Thiamin, pH 6,8) 12 bis 18 h bei 37° C und 500 U/min bebrütet wurden. Ihre Enterotoxinausbeute betrug 0,5 bis 1 µg SED/ml Kulturüberstand und lag damit ebenfalls niedriger als die eigenen Erträge. Allerdings ist zu berücksichtigen, daß CHANG und BERGDOLL (1979) im Fermenter mit Produktionsansätzen von 20 l arbeiten konnten.

Eine Alternative zur Produktion von SE in flüssigen Nährmedien ist die SE-Gewinnung mit der "sac-culture"-Technik nach DONELLY et al. (1967). Bei diesem Züchtungsverfahren sind Medium und Staphylokokken durch eine semipermeable Membran getrennt, das Medium befindet sich in einem Dialysierschlauch, die Staphylokokken außerhalb. Die Methode dient eigentlich nur zum Nachweis des SE-Bildungsvermögens von Staph.-Stämmen, da hiermit zwar relativ hohe SE-Konzentrationen erreicht werden, die SE-Mengen aber aufgrund des niedrigen Ansatzes an Kulturflüssigkeit (20 ml) gering sind. Bei Verwendung größerer Kolben und Dialysierschläuche kann das Volumen der Kulturflüssigkeit jedoch gesteigert werden (BERGDOLL, 1979). In den eigenen Untersuchungen wurde geprüft, ob sich durch Erhöhung des Kulturflüssigkeit-Volumens mit dem "sac-culture"-Verfahren nicht höhere SED-Ausbeuten erzielen lassen als in flüssigen Nährmedien. Zu diesem Zweck wurden "sac-cultures" in 2 l-Erlenmeyerkolben mit 50 ml Kulturflüssigkeit (*S. aureus* 1151m) und 400 ml doppeltkonzentrierter (7,4%iger) BHI-Bouillon, die in einem Dialysierschlauch von 2 cm Breite und 1,30 m Länge enthalten war, angesetzt. Nach 40 h Bebrütung im Schüttelbrutschrank bei 37° C und 110 U/min waren in den "sac-cultures" ca. 4,6 µg SED/ml nachzuweisen. Damit lag der Enterotoxinertrag pro Kolben bei ca. 0,23 mg, während in 400 ml-Portionen des flüssigen Nährmediums ca. 0,37 mg SED enthalten waren.

Nach NOTERMANS und DUFRENNE (1982) bietet der Einsatz der "sac-culture"-Technik zur Produktion von SE für Reinigungsversuche den Vorteil, daß kleine Kulturvolumina aufzuarbeiten sind. Dies konnte jedoch insofern nicht bestätigt werden, als daß, um das Enterotoxin vollständig zu entfernen, die Kolben nach Entnahme der Bakteriensuspension mit jeweils ca. 100 ml A. dest. nachgespült werden mußten, wodurch die Enterotoxinkonzentration der "sac-culture" stark abnahm. Der Enterotoxinertrag der "sac-cultures" war

damit sowohl im Hinblick auf die Gesamtmenge als auch auf die erzielten Toxinkonzentrationen enttäuschend und konnte nicht den Mehraufwand rechtfertigen, der bei der SED-Produktion in "sac-cultures" für die Vorbereitung der Kolben und Herstellung der Inokula erforderlich war.

Die Gewinnung der SE aus großen Volumina des Kulturüberstandes ist nach BERGDOLL (1970, 1972) eines der Hauptprobleme ihrer Reinigung. Anfänglich sind die SE mit verschiedenen chemischen Agenzien aus dem Kulturüberstand ausgefällt worden, was sich jedoch nicht bewährt hat. Später wurden die enterotoxinhaltigen Kulturüberstände konzentriert, wobei nur vergleichsweise geringe Volumina aufgearbeitet werden konnten (s. Seite 18 ff.). Heute erfolgt die Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand meist durch Adsorption an Ionenaustauscher (s. Tab.10).

Auch in den eigenen Versuchen wurde diese Methode für die Abtrennung des Toxins aus dem Kulturüberstand eingesetzt. Zur Adsorption von SED aus dem Überstand von Schüttelkulturen (3 % C/ELP, 3 % C/ESX, 1 % Hefe) des *S. aureus*-Stammes 1151m kamen dabei Amberlite CG-50 oder CM-Cellulose zum Einsatz. Amberlite CG-50 ist ein schwachsaures Acrylharz mit hoher Ladungsdichte und hoher Kapazität, CM-Cellulose dagegen ein speziell für die Proteinchromatographie entwickelter Ionenaustauscher, der eine niedrigere Ladungsdichte als Amberlite CG-50 aufweist und deswegen mildere Elutionsbedingungen gestattet. Außerdem unterscheidet sich CM-Cellulose von Amberlite CG-50 durch ihre höhere Permeabilität.

Die Abtrennung von SED an Amberlite CG-50 aus dem Kulturüberstand erfolgte nach CHANG und BERGDOLL (1979): Nach Adsorption von SED aus dem Kulturüberstand an mit 0,02 M Phosphatpuffer, pH 5,6, äquilibriertes Amberlite CG-50 wurde der Austauscher in eine Säule gepackt, die Nährbodenverunreinigungen mit A. dest. ausgewaschen und anschließend das Toxin mit 0,5 M NaCl in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,2, eluiert. SED wurde mit diesem Trennungsgang bei einer Toxinausbeute von ca. 80 % etwa 31fach angereichert (= Reinheitsgrad 0,0014 %). Das Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da CHANG und BERGDOLL (1979) nach Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand mit Amberlite CG-50 für das Toxin einen Reinheitsgrad von 2 % ermittelt hatte und ihre Toxinausbeute 90 % betrug. MÜLLER (1981) hat bei der Abtrennung von SED an Amberlite CG-50 unter den von

CHANG und BERGDOLL (1979) empfohlenen Bedingungen mit einer Toxinausbeute von 79 % und eine Reinheit des abgetrennten Toxins von 0,45 % allerdings ebenfalls schlechtere Ergebnisse erzielt. Die Ursache für diese Differenzen ist nicht bekannt.

SCHANTZ et al. (1965, 1972) hatten darauf hingewiesen, daß SEA und SEB nach Abtrennung aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 in einem Volumen vorlagen, das 0,4 bzw. 1 % des Kulturüberstand-Ausgangsvolumens entsprach. In den eigenen Untersuchungen führte die Ionenaustauschchromatographie auf Amberlite CG-50 jedoch trotz hoher Ionenstärke des Elutionspuffers zu flachen breiten Peaks (Abb. 3), was in einer starken Verdünnung der Enterotoxinlösungen resultierte und die Weiterreinigung von SED erschwerte. Erklärt werden kann diese auch von FEY et al. (1984) beschriebene Beobachtung vermutlich mit der relativ hohen Ladungsdichte von Amberlite CG-50, die offenbar eine sehr starke Bindung der SE bewirkt.

Um SED aus 4400 ml Kulturüberstand an CM-Cellulose zu binden, waren 1000 g mit 0,01 M Phosphatpuffer, pH 5,5 äquilibrierter CM-Cellulose erforderlich; der Einsatz niedrigerer Mengen führte zu einer drastischen Senkung der Toxinausbeute. Nach Adsorption des Toxins an CM-Cellulose im Batchverfahren wurde der Austauscher in eine Säule gepackt, die Nährbodenverunreinigungen mit Startpuffer ausgewaschen und das Toxin mit 0,3 M NaCl in 0,07 M Phosphatpuffer, pH 6,8, eluiert. Die Toxinausbeute der CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie lag mit 70 % um ca. 10 % niedriger als bei der Chromatographie auf Amberlite CG-50, jedoch konnte das Toxin mehr als doppelt so stark angereichert und die Probenlösung auf 9 % des Kulturüberstand-Ausgangsvolumens konzentriert werden. Daher wurde der CM-Cellulose für die Durchführung des ersten Reinigungsschrittes der Vorzug gegeben. FEY et al. (1984) hatten bei der Gewinnung von SE aus dem Kulturüberstand ebenfalls Amberlite CG-50 durch CM-Cellulose ersetzt. SED wurde nach Adsorption aus dem Kulturüberstand (3 l) an 180 bis 250 ml CM-Cellulose mit 0,25 M NaCl in 0,5 M Phosphatpuffer, pH 6,2, in einem deutlich abgesetzten und leicht zu isolierenden Peak eluiert, wobei die Toxinausbeute 61 % betrug. Die im Vergleich zu den eigenen Ergebnissen niedrigere Toxinausbeute könnte darauf zurückzuführen sein, daß die relativ geringen Cellulose-Mengen, die eingesetzt wurden, nicht ausreichten, um SED aus dem Kulturüberstand zu gewinnen.

Als nächste Reinigungsmethode nach Gewinnung von SED aus dem Kulturüberstand mittels Ionenaustauschchromatographie wurde die Chromatofokussierung (CF) gewählt. Da ein hoher Salzgehalt der Probe bei dieser Methode stört und außerdem geringe Probenvolumina benötigt werden, war es vorher erforderlich, die Probenlösungen zu konzentrieren und zu entsalzen. In den in der Literatur beschriebenen Verfahren zur Reinigung von SE erfolgten Konzentrierungsschritte meist durch Lyophilisation, daneben aber auch durch Evaporation, Ultrafiltration und Dialyse gegen PEG. Für die Entsatzung und Äquilibration hat man fast ausschließlich Dialyse eingesetzt (s. 2.3.6). Nach ENDE et al. (1983) sind Konzentrierungs- und Entsatzungsschritte über Membrantrennungen (Dialyse, Hohlfaserdialyse, Ultrafiltration) jedoch mit hohen Toxinverlusten (<80 %) verbunden, da SE irreversibel an künstliche Membranen gebunden werden sollen. Daher wurde in den eigenen Untersuchungen auf diese Methoden verzichtet und, wie von ENDE et al. (1983) empfohlen, Gelfiltration an Sephadex G-50 und Evaporation (mit Hilfe eines Rotationsverdampfers mit Kühlfalle) zum Entsatzen bzw. Konzentrieren der Probenlösungen verwendet. Da bei der Entsatzung an Sephadex G-50 nach Angaben des Herstellers ein Probenvolumen von ca. 30 % des Säulenvolumens nicht überschritten werden soll, mußte das Eluat der Cellulose-Säule zur Entsatzung auf etwa 50 % seines Ausgangsvolumens eingengt werden. Anschließend wurde die eingengte Probe an Sephadex G-50 mit A.dest. unter hoher Fließgeschwindigkeit entsalzt. Es konnten mehrere Peaks eluiert werden, von denen der unmittelbar nach dem Ausschlußvolumen eluierte 75 % der aufgetragenen SED-Menge sowie 22 % des eingesetzten Gesamtproteins enthielt (Abb. 4). ENDE et al. (1983) war es gelungen, große Volumina SEB- und SEC<sub>1</sub>-haltiger Lösungen mit Toxinverlusten von weniger als 10 % zu entsalzen. Da SEB und SEC<sub>1</sub> ein ganz ähnliches Molekulargewicht haben wie SED, mag die höhere Ausbeute an entsalztem SEB und SEC<sub>1</sub> bei der Gelfiltration an Sephadex G-50 darauf zurückzuführen sein, daß von diesen Toxinen größere Mengen auf die Säule aufgetragen werden konnten, wodurch Verluste anteilmäßig nicht so stark ins Gewicht fielen. Die Produktionsausbeute ist bei SEB und SEC<sub>1</sub> nämlich wesentlich höher als bei SED (s.Tab.9).

Nach der Entsatzung wurde die SED-Probe in den eigenen Untersuchungen erneut durch Evaporation eingengt und anschließend in der Chromatofokussierung eingesetzt.

Bei der CF werden Proteine säulenchromatographisch nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) getrennt. SED besteht ebenso wie die anderen SE-Typen aus mehreren Komponenten mit unterschiedlichem pI, was als Mikroheterogenität bezeichnet wird (BERGDOLL, 1979). Für die Hauptkomponente von SED haben frühere Untersucher (CHANG und BERGDOLL, 1979) einen pI von 7,4 ermittelt. Daher wurde die CF von SED zunächst im pH-Bereich von 8,4 bis 6,0 durchgeführt. Dieser Bereich erwies sich jedoch als zu niedrig für die Trennung von SED, da der pH-Gradient der Säule sich erst ab pH 7,5 ausbildete, ein Teil der aufgetragenen SED-Menge aber gemeinsam mit einem Gemisch von Exoproteinen oberhalb dieses pH unbeeinflusst die Säule passierte. Später wurde daher zur CF von SED ein pH-Bereich von 9,2 - 7,0 gewählt. Die Firma Pharmacia (Uppsala, Schweden) - mit Reagenzien für die CF bisher allein auf dem Markt - empfiehlt, bei der Chromatofokussierung im pH-Bereich von 9,4 bis 6,0 Polybufferaustauscher PBE 94 einzusetzen und die Elution mit Polybuffer 96 durchzuführen. ENDE et al. (1983), die SEB und SEC<sub>1</sub> über CF reinigten, haben jedoch bei der Elution mit Pharmalyten, Typ 6,5 - 9, vergleichbare Ergebnisse erzielt, wobei Pharmalyte sich aber wesentlich besser von den SE abtrennen ließen als Polybuffer. So konnten Pharmalyte aus gereinigten SEB- und SEC<sub>1</sub>-Präparaten leicht durch Gelfiltration an Sephadex G-50 entfernt werden. Die Abtrennung von Polybuffern aber, die aus längeren Peptidketten bestehen und höhere Molgewichte simulieren als Pharmalyte, gelang weder durch Gelfiltration an Sephadex G-50 noch an G-75. Alternative Methoden zur Abtrennung der Polybuffer aus den SE-Präparaten waren mit hohen Toxinverlusten assoziiert. Da SED ein ganz ähnliches Molgewicht aufweist wie SEB und SEC<sub>1</sub> (Tab. 1), war auch für diesen Toxintyp mit Problemen bei der Abtrennung von Polybuffern mittels Gelfiltration zu rechnen. Daher wurde in den eigenen Untersuchungen auf den Einsatz der preislich günstigeren Polybuffer verzichtet und die CF im pH-Bereich von 9,2 - 7,0 in Anlehnung an ENDE et al. (1983) mit Pharmalyten (pH 6,5 - 9), pH 6,5, durchgeführt, wobei sich auf der Säule ein pH-Gradient im Bereich von 8,0 - 7,0 ausbildete. Mit diesem pH-Gradienten wurde SED in vier Fraktionen aufgelöst (Abb. 5a). Der Hauptanteil von SED wurde in Fraktion F (pI 7,35) eluiert, geringere Mengen in den Fraktionen C (pI 8,0), E (pI 7,75) und G (pI 7,15). In einem Teil der Versuche verschob sich jedoch der pI-Wert von Fraktion G trotz genau gleichen Verlaufs des pH-Gradienten von 7,15 nach 7,25, wodurch die Fraktionen F

und G nicht mehr aufgelöst, sondern gemeinsam in einer Fraktion (Fraktion F/G) eluiert wurden (Abb. 5b). Eine Überschreitung der Probenkapazität kommt als Erklärung hierfür nicht in Frage, da dieses Phänomen auch bei geringen Mengen (100 mg) an Probenprotein auftrat. Möglicherweise läßt sich die Verschiebung von Fraktion G zu einem höheren pH aber darauf zurückführen, daß in Fraktion G enthaltenes Protein eine flache Titrationskurve aufweist und damit eine geringe Ladung in der Nähe seines pI. Proteine mit flacher Titrationskurve werden bei der CF im Bereich ihres pI leicht durch konkurrierende Ionen vom Austauscher abgetrennt und dann bei einem pH eluiert, der höher ist als ihr pI. Die Fraktionen F und G wurden - unabhängig ob getrennt oder nicht getrennt - jeweils in breiteren Peaks und stärker verdünnt eluiert als die Fraktionen C und E, da der pH-Gradient leicht konkav verlief und im hinteren Abschnitt flacher war als am Anfang. Alle Toxinpeaks waren aber, mit Ausnahme desjenigen, der aus der unvollständigen Trennung der Fraktionen F und G resultierte, weitgehend symmetrisch und gut abgrenzbar. Die starke Heterogenität der CF-Fraktionen in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) war daher überraschend. So wurde Fraktion C in der IEF im Bereich von pH 9,3 bis 7,6 in neun Komponenten aufgelöst (Abb. 6, Probe a). Fraktion E ließ sechs Komponenten erkennen, von denen alle mit Ausnahme der pI 7,4-Komponente bereits in Fraktion C enthalten waren (Abb. 6, Probe b). Fraktion F bestand in der IEF aus 7, Fraktion G aus 5 Komponenten (Abb. 6, Probe c und d).

Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die IEF bei 4 ° C und die CF bei 25 ° C (Zimmertemperatur) durchgeführt wurden, wiesen die in der IEF gefundenen pI-Werte der Hauptkomponenten von Fraktion C, E und F gute Übereinstimmung mit den pI-Werten auf, die in der CF für diese Fraktionen ermittelt wurden. Bei Fraktion G zeigte sich hier jedoch eine deutliche Abweichung. Während Fraktion G in der CF bei pH 7,25 bzw. 7,15 eluiert wurde, fokussierte sich ihre Hauptkomponente in der IEF bei pH 8,8 (Abb. 6, Probe d). Dieses Phänomen trat auch auf, wenn Fraktion G ohne vorherige Konzentrierung unmittelbar nach der CF in der IEF untersucht wurde. Offenbar wandelte sich der pI-Wert der Hauptkomponente von Fraktion G direkt nach Verlassen der Säule von 7,15 in 8,8 um. Worauf diese Umwandlung beruhte, konnte nicht festgestellt werden.

Als weiterer Parameter, um die durch CF gereinigten Toxinfractionen zu untersuchen, diente die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE), die in Form der Ultradünnschichtgel-Elektrophorese nach GÖRG et al. (1980; 1981; 1982) durchgeführt wurde. Vorher wurden jedoch die Fraktionen C und E, die ein ähnliches IEF-Muster aufwiesen und die Fraktionen F und G, die ohnehin nur nach einem Teil der Versuche getrennt vorlagen, jeweils vereinigt (zu Fraktion C/E bzw. F/G). Zur Analyse in der SDS-PAGE war es erforderlich, die Pharmalyte aus den SED-Präparaten abzutrennen, da die Pharmalyte sonst während des Elektrophorese-Laufs aufgrund von Interaktionen mit SDS ausgefällt wurden. Ausgefällte Pharmalyte konnten nicht mehr aus dem Gel entfernt werden und färbten sich bei den Visualisierungsschritten an, was ein Auffinden der Proteinbanden erschwerte oder sogar unmöglich machte. Mittels Gelfiltration an Sephadex G-75 gelang es, die Pharmalyte quantitativ von SED zu trennen (Abb. 7). Gelfiltration an Sephadex G-50, von ENDE et al. (1983) zur Entfernung der Pharmalyte aus SEB- und SEC<sub>1</sub>-Präparaten empfohlen, erbrachte schlechtere Ergebnisse. Nach Abtrennung der Pharmalyte wurden die Toxinfractionen zunächst noch einmal in der IEF untersucht, um zu prüfen, ob sich das IEF-Muster verändert hatte. Dabei wurden jeweils zusätzliche Komponenten gefunden, die offensichtlich während der Abtrennung der Pharmalyte aus bereits vorher vorhandenen Komponenten entstanden waren (Abb. 6, Probe f und g). Die Untersuchung in der SDS-PAGE ergab dann für die Fraktion C/E' (Fraktion C/E nach Abtrennung der Pharmalyte) sechs Komponenten (42.000, 37.000, 35.000, 28.000, 20.100, 14.400), wobei die Hauptkomponente dem Molgewichtsbereich von 28.000 zuzuordnen war (Abb. 8, Probe a). Fraktion F/G' (Fraktion F/G nach Abtrennung der Pharmalyte) wies in der SDS-PAGE zwei etwa gleichstarke Komponenten mit einem Molgewicht von 37.000 bzw. 28.000 auf und daneben eine schwächere Bande mit 14.400 (Abb. 8, Probe c). Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigte, daß es sich bei den pI-Komponenten der Fraktionen C/E' und F/G' nicht ausschließlich um SED handelte, sondern in den Fraktionen mehrere Substanzen enthalten waren.

Um den für SED gewünschten Reinheitsgrad zu erzielen, war daher ein weiterer Reinigungsschritt erforderlich. Die Untersuchung der Fraktionen C/E' und F/G' in der SDS-PAGE (Abb. 8, Probe a und c) hatte jeweils Komponenten mit einem relativ breiten Molekulargewichtsspektrum ergeben. Für die Weiterreinigung dieser Fraktionen wurde daher die Ausschlußchromatogra-

phie gewählt. Die Ausschlußchromatographie erfolgte unter den Bedingungen der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie an den Proteinsäulen I-125 (0,78 x 30 cm; Waters GmbH) mit 0,1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in 0,05 M Phosphatpuffer, pH 5,0, bei einer Durchflußrate von 0,9 ml/min. Aufgrund des unterschiedlichen Bandenmusters in der SDS-PAGE wurden die Fraktionen C/E' und F/G' getrennt zur Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie eingesetzt. Das Elutionsdiagramm beider Proben zeigte drei Fraktionen (Abb. 9 und 10). Die Elution des Hauptanteils von SED erfolgte jeweils in der Fraktion mit den kürzesten Retentionszeiten (RT), nämlich bei der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Fraktion C/E' bei RT von 15,2 bis 20,1 (Fraktion Ia) und für Fraktion F/G' bei RT von 16,0 bis 20,3 (Fraktion IIa). Aber auch die nachfolgend eluierten Fraktionen Ib (RT 20,1 - 28,1) und IIb (RT 20,3 - 26,6) wiesen SED-Spezifität auf. Bei der Rechromatographie der vereinigten Fraktionen Ib und IIb wurde die Hauptaktivität wiederum in einer Vorfraktion eluiert, die mit RT von 15,8 bis 21,2 das nahezu gleiche Retentionsvolumen wie die Fraktionen Ia und IIa aufwies. Die serologische Aktivität in den Fraktionen Ib und IIb beruhte demzufolge auf einem "Tailing"-Effekt.

Die nach der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie gewonnenen Fraktionen Ia und IIa wurden in der SDS-PAGE analysiert. Die Fraktion IIa zeigte dabei nur eine Bande, die durch Vergleich mit Eichproteinen einem Molgewicht von 28.000 zuzuordnen war (Abb. 8, Probe d und e). Fraktion Ia wies dagegen zwei zusätzliche Komponenten mit 20.100 und 14.400 Dalton auf (Abb. 8, Probe b). Ein Vergleich mit den Bandenmustern der Fraktionen C/E' und F/G' ergab, daß durch die Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie von Fraktion Ia ausschließlich höhermolekulare Komponenten und von Fraktion IIa Komponenten mit einem Molgewicht von 14.400 und 37.000 abgetrennt worden waren. Die Tatsache, daß höhermolekulare Komponenten aus den Toxinfraktionen eliminiert worden waren, überraschte, da die abgetrennten Komponenten - wie aus den Elutionsdiagrammen in Abb. 9 und 10 hervorgeht - jeweils eine geringere Molekülgröße aufwiesen. Diese Diskrepanz läßt sich mit nicht übereinstimmenden Relationen zwischen Molekülgröße und Molekulargewicht erklären, kann aber auch auf die Bildung von Polymeren in der SDS-PAGE oder Entstehung von Spaltprodukten in der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie zurückzuführen sein.

Bei der Untersuchung in der IEF wies Fraktion IIa drei Hauptkomponenten

bei pH 8,1, pH 7,8 und pH 7,4 auf, weitere relativ starke Komponenten fokussierten sich bei pH 7,55, pH 7,35 und pH 7,25, und schwache Komponenten lagen bei pH 7,7 und pH 6,85 (Abb. 6, Probe i). Damit wurde die bereits durch die Chromatofokussierung dokumentierte Heterogenität von SED bestätigt.

Die Gesamt-Toxinausbeute nach der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie betrug 25 %, 5 % dieses Toxins waren in Fraktion Ia enthalten, 20 % in Fraktion IIa. Somit war durch Abtrennung des Toxins aus dem Kulturüberstand an CM-Cellulose, Chromatofokussierung und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie, bei einer Toxinausbeute von 20 %, reines SED gewonnen worden, das sich in der SDS-PAGE als homogen erwies.

Nach NOTERMANS und DUFRENNE (1982) kann die Reinigung von SE durch Produktion in "sac-cultures" statt in flüssigen Nährmedien vereinfacht werden, da die Kulturflüssigkeit der "sac-cultures" keine Nährmedium-Bestandteile enthält. In den eigenen Versuchen wurde daher geprüft, ob die Reinigung von SED durch Produktion des Toxins mit dem "sac-culture"-Verfahren zu vereinfachen war. Es zeigte sich jedoch, daß zur Isolierung von SED aus diesen Kulturen genau die gleichen Schritte durchgeführt werden mußten, wie sie zur Reinigung des Toxins aus flüssigen Nährmedien erforderlich waren. Der einzige Vorteil der alternativen Produktionsmethode bestand darin, daß statt 1000 g nur 600 g CM-Cellulose zur Adsorption des Toxins aus dem Kulturüberstand eingesetzt werden mußten, wodurch sich der Zeitaufwand für die Vorbereitung des Ionenaustauschers verringerte.

Bei einem Vergleich des eigenen Verfahrens zur Reinigung von SED mit den Verfahren anderer Autoren müssen jene von CASMAN et al. (1967), IGARASHI (1972), LANGNER und KLOES (1974) und YAMADA (1977a) nicht berücksichtigt werden, da diese Autoren SED nicht rein darstellen konnten. CHANG und BERGDOLL (1979) hingegen gelang es, SED durch Adsorption aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50, zweimalige CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie sowie zweimalige Gelfiltration an Sephadex G-75 zu isolieren, wobei die Toxinausbeute ca. 20 % betrug. Ihr Verfahren ist im Vergleich zum eigenen, in dem SED ebenfalls mit einer Ausbeute von 20 % rein dargestellt wurde, langwierig und zeitraubend. Gleiches gilt für das Verfahren von KARSCH und RICHTER (1979), das aus

zweimaliger CM-Cellulose-Ionenaustauschchromatographie, zweimaliger Gelfiltration an Sephadex G-100 sowie IEF im Dichtegradienten besteht und sich zur Reinigung aller SE-Typen eignen soll. MÜLLER (1981), NOTERMANS et al. (1983) und FEY et al. (1984) bedienten sich bei der SED-Reinigung der präparativen IEF in Flachgelen, wobei das Toxin jeweils in einem Dreischritt-Verfahren - mit Ionenaustausch, IEF und Gelfiltration an Sephadex G-75 (NOTERMANS et al., 1983) bzw. Ionenaustausch und zwei Fokussierschritten (MÜLLER, 1981; FEY et al., 1984) isoliert werden konnte. Hinsichtlich des Zeitaufwandes waren diese Verfahren dem eigenen vergleichbar und MÜLLER et al. (1981) sowie FEY et al. (1984) erzielten sogar eine Gesamt-Toxinausbeute, die mit 28 % um 8 % höher als die eigene lag. Trotzdem wurde in den eigenen Versuchen der CF der Vorzug gegeben, da bei der IEF nach Beobachtung von HALLANDER (1966) und BORJA et al. (1972) eine Denaturierung der SE durch aus hohen Stromstärken resultierende Hitzeeffekte nicht auszuschließen ist. Abschließend soll noch das Reinigungsverfahren von JANIN et al. (1983) erwähnt werden, die SED nach Adsorption aus dem Kulturüberstand an Amberlite CG-50 und CF im "fast protein liquid chromatography" (FPLC)-System (Pharmacia) mit einem Reinheitsgrad von 80 % gewinnen konnten. Da in eigenen Versuchen der Reinheitsgrad des Toxins nach der CF nur 20 % (Fraktion C/E') bzw. 35 % (Fraktion F/G') betrug, ist das Auflösungsvermögen der CF im FPLC-System offensichtlich höher als bei der CF im klassischen Niederdrucksystem. Zur Hochreinigung von SED wäre jedoch auch nach der CF im FPLC-System noch ein dritter Schritt erforderlich gewesen.

## 5. Zusammenfassung

Im Hinblick auf die Gewinnung eines spezifischen Antiserums wurde Staphylokokken-Enterotoxin D (SED) produziert und gereinigt.

Für die SED-Produktion standen die Staphylococcus (S.) aureus-Stämme 472, 494 und 1151m zur Verfügung, deren Enterotoxinogenität geprüft wurde. Als bester Toxinproduzent erwies sich dabei S. aureus 1151m. Mit diesem Stamm wurden sieben Proteinhydrolysate auf ihr Eignung als wesentlicher Nährbodenbestandteil bei der Produktion von SED untersucht. Außerdem wurde der Einfluß verschiedener Zusätze (Thiamin, Niacin, Hefeextrakt), des Anfangs-pH-Wertes des Mediums, der Inkubationszeit und -temperatur, der Schüttelgeschwindigkeit des Brutschranks sowie des Verhältnisses von Nährbodenmenge zu Gefäßvolumen getestet. Die höchsten Toxinausbeuten wurden unter folgenden Bedingungen erzielt:

- |                                                                                             |   |                                          |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------|
| - Nährbodenzusammensetzung                                                                  | : | 3 % C/ELP, 3 % C/ESX und 1 % Hefeextrakt |
| - Anfangs-pH des Mediums                                                                    | : | pH 7,6                                   |
| - Nährbodenmenge (bei Verwendung von 2 l-Erlenmeyerkolben und einer Einsaatmenge von 2,5 %) | : | 400 ml                                   |
| - Inkubationszeit                                                                           | : | 48 h                                     |
| - Inkubationstemperatur                                                                     | : | 40° C                                    |
| - Schüttelgeschwindigkeit                                                                   | : | 275 U/min                                |

Unter Kultivierung von S. aureus 1151m wurde SED auch mit dem "sac-culture"-Verfahren produziert. Mit diesem Verfahren erzielte SED-Erträge/ml waren etwa vier- bis fünfmal so hoch wie die in Schüttelkulturen.

Zur Reinigung von SED wurde ein chromatographisches Drei-Schritt-Verfahren entwickelt, mit dessen Hilfe es gelang, SED bei einer Ausbeute von 20 % in hochgereinigter Form aus dem Rohtoxin von S. aureus 1151m zu isolieren. Zur Gewinnung des Toxins aus dem Kulturüberstand wurde zunächst die Adsorption an Amberlite CG-50 geprüft. Die Ergebnisse waren im Hinblick auf die Anreicherung des Toxins und die Konzentrierung der Probenlösungen unbefriedigend. Daher wurde SED durch Adsorption an CM-Cellulose aus dem Kultur-

überstand gewonnen. Nach der Entsalzung mittels Gelfiltration an Sephadex G-50 folgte die Reinigung des Toxins durch Chromatofokussierung und Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie. Das gereinigte SED erwies sich bei der Untersuchung in der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese als homogen. In der isoelektrischen Fokussierung ließ das Toxin im Bereich von pH 6,85 bis 8,1 acht Komponenten erkennen; Hauptkomponenten fokussierten sich bei pH 8,1, 7,8 und 7,4.

Zwei Schafe wurden mit hochgereinigtem SED in steigender Konzentration intramuskulär immunisiert. Die maximal applizierte Toxindosis betrug 500 µg. Nach der Immunisierung wurde bei einem der beiden Tiere ein spezifischer Anti-SED-Präzipitationstiter von 1:1000, bei dem anderen jedoch nur von 1:60 nachgewiesen.

## Summary

### Contribution to Production and Purification of Staphylococcal Enterotoxin D

To provide a specific antiserum staphylococcal enterotoxin D (SED) was produced and purified. For production of SED the *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* strains 472, 494 und 1151m were available, which were examined for their SED producing capacity. *S.aureus* 1151m was found to produce the highest amount. While cultivating this strain seven protein hydrolysates were tested on their results in production of SED. Besides this the influence of different supplements (thiamin, niacin and yeast extract), starting pH of the medium, incubation period and temperature, shaking speed of the incubator as well as the ratio medium-to-flask volume was examined. Highest amounts of enterotoxin were obtained under the following conditions:

- composition of the medium : 3 % C/ELP and 3 % C/ESX supplemented with 1 % yeast extract
- starting pH of the medium : pH 7.6
- medium volume (using 2 l Erlenmeyer-flasks and adding an inoculum of 2.5 %) : 400 ml
- incubation temperature : 40° C
- incubation time : 48 h
- shaking speed : 275 rpm

SED was also produced (*S.aureus* 1151m) by the sac-culture method. This method yielded amounts of SED per ml, which were four to five times higher than the ones produced in shake flasks.

For purification of SED a chromatographical procedure was developed, consisting of three steps. This procedure enabled the isolation of highly purified SED from cultures of *S.aureus* 1151m with yields of 20 %. Removal of the toxin from the culture supernatant fluid was first performed by adsorption on Amberlite CG-50. However this method proved to be unsatisfactory with respect to both enrichment of the toxin and concentrating of the toxin solutions. Therefore removal of the toxin from the supernatant was

carried out using CM-Cellulose. After desalting the toxin purification was accomplished by chromatofocusing and high performance liquid chromatography. The purified toxin is homogenous by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. When analyzed by isoelectric focusing the toxin revealed eight components between pH 6.85 and 8.1, major components focused at pH 8.1, 7.8 and 7.4.

Antisera to the highly purified toxin were prepared in sheeps by injecting the toxin intramuscularly in increasing amounts. The maximal dose applied was 500 µg. After immunization one of the animals showed a specific anti-SED precipitation titre of 1:1000, the other however a titre of merely 1:60.

## 6. Literaturverzeichnis

AVENA, R.M. und M.S. BERGDOLL (1967):

Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus* strain 361.

Biochemistry 6, 1474-1480

BAIRD-PARKER, A.C. (1971):

Factors affecting the production of bacterial food poisoning toxins.

J. Appl. Bact. 34, 181-197

BAUMGART, J. (1970):

Konservierung von Bakterien durch Trocknen an Porzellanbruchstücken.

Die Fleischwirtschaft 50, 966

BENNETT, R.W. (1971):

Unveröffentlichte Ergebnisse, zit. nach CHESBRO, W. und V. KUCIC (1971):  
Beta hemolysin: a persistent impurity in preparations of staphylococcal nuclease and enterotoxin.

Appl. Microbiol. 22, 233-241

BERGDOLL, M.S. (1967):

The staphylococcal enterotoxins, in: MATELES, R.I. und G.N. WOGAN:

Biochemistry of some foodborne microbial toxins, p. 1-25.

M.I.T. Press, Cambridge, Massachusetts

BERGDOLL, M.S. (1969):

Bacterial toxins in food.

Food Technol. 23, 530-533

BERGDOLL, M.S. (1970):

Enterotoxins, in: MONTIE, T.C., S. KADIS und S.J. AJL: Microbial toxins,  
Bd. 3 (Bacterial protein toxins); p. 265-326.

Academic Press, New York und London

BERGDOLL, M.S. (1972):

The enterotoxins, in: COHEN, J.O.: The staphylococci, p. 301-331.

Wiley-Interscience, New York, London, Sydney und Toronto

BERGDOLL, M.S. (1979):

Staphylococcal intoxications, in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN: Food-borne infections and intoxications, 2. Aufl., p. 443-494.

Academic Press, New York, London und San Francisco

BERGDOLL, M.S. (1983):

Enterotoxins, in: EASMON, C.S.F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organisms in vivo and in vitro), p. 559-598.

Academic Press, London

BERGDOLL, M.S. und R.-N. ROBBINS (1973).

Characterization of types of staphylococcal enterotoxins.

J. Milk Food Technol. 36, 610-612

BERGDOLL, M.S. und P.M. SCHLIEVERT (1984):

Toxic-shock-syndrome toxin-one.

Am. Soc. Microbiol. News 50, 525

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1959a):

Staphylococcal enterotoxin. I. Purification.

Arch. Biochem. Biophys. 85, 62-69

BERGDOLL, M.S., M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1959b):

Staphylococcal enterotoxin: Identification of a specific precipitating antibody with enterotoxin-neutralizing property.

J. Immunol. 83, 334-338

BERGDOLL, M.S., H. SUGIYAMA und G.M. DACK (1961):

The recovery of staphylococcal enterotoxin from bacterial culture supernatants by ion exchange.

J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3, 41-50

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA und R.M. AVENA (1965):

Identification of a new enterotoxin as enterotoxin C.

J. Bact. 90, 1481-1485

BERGDOLL, M.S., J.L. KADAVY, M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1951):  
Partial purification of staphylococcal enterotoxin.  
Arch. Biochem. Biophys. 33, 259-262

BERGDOLL, M.S., B. LAVIN, M.J. SURGALLA und G.M. DACK (1952):  
Chromatography in the purification of staphylococcal enterotoxin.  
Science 116, 633-634

BERGDOLL, M.S., C.R. BORJA, R.N. ROBBINS und K.F. WEISS (1971):  
Identification of enterotoxin E.  
Infect. Immun. 4, 593-595

BERGDOLL, M.S., A.L. NOLETO, R.F. REISER und R.N. ROBBINS (1979):  
Unveröffentlichte Ergebnisse, zit. nach BERGDOLL, M.S. (1983):  
Enterotoxins, in: EASMON, C.S.F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphy-  
lococcal infections, Bd. II (The organisms in vivo and in vitro), p. 559-598.  
Academic Press, London

BERGDOLL, M.S., F.S. CHU, I.-Y. HUANG, C. ROWE und SHIH (1965):  
Staphylococcal enterotoxin B. III. The physicochemical properties and the N-  
and C-terminal amino acid sequences.  
Arch. Biochem. Biophys. 112, 104-110

BERGDOLL, M.S., R.F. REISER, B.A. CRASS, R.N. ROBBINS und J.B.  
DAVIS (1981):  
A new staphylococcal enterotoxin F, associated with Toxic-Shock-Syndrome  
Staphylococcus aureus isolates.  
Lancet, 1, 1017-1021

BERGER, I. und G. OHLENSCHLÄGER (1984):  
Grundlagen der Elektrophorese und spezielle elektrophoretische Trennmethoden.  
Teil I mta-journal 6, 135-143

BERMAN, R.E., R.W. GILPIN und R.A. KNIGHT (1981):  
Enterotoxin synthesis by clinical isolates of staphylococci.  
Laboratory Medicine 12, 621-622, 654

BORJA, C.R. und M.S. BERGDOLL (1967):  
Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by Sta-  
phylococcus aureus strain 137.  
Biochemistry 6, 1467-1473

BORJA, C.R., E. FANNING, I.-Y. HUANG und M.S. BERGDOLL (1972):  
Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin E.

J. Biol. Chem. 247, 2456-2463

BOWDEN, J.P. (1968):

A method for preparing small quantities of  $^{14}\text{C}$ -labeled staphylococcal enterotoxin B.

Biochim. Biophys. Acta 168, 150-152

BRÜCKLER, J., H. KLIMA, W. SCHAEGER, D. MANZ und H. BLOBEL (1981):  
Staphylococcus aureus von Kühen mit subklinischen Euterinfektionen.

Zbl. Vet. Med. B 28, 494-499

BURKHARD, G. (1980):

Versuch zur Isolierung und Reinigung von Staphylokokken Enterotoxin E. Anwendung des Dreiperlen-ELISA von Stiffler und Fey zum Nachweis von Enterotoxin bei pathogenen Staphylokokken Stämmen.

Vet. Med. Diss., Bern

CASMAN, E.P. (1958):

Serologic studies of staphylococcal enterotoxin.

Publ. Health Rep. 73, 599-609

CASMAN, E.P. (1960):

Further serological studies of staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 79, 849-856

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1963):

Culture medium for the production of staphylococcal enterotoxin A.

J. Bact. 86, 18-23

CASMAN, E.P. und R.W. BENNETT (1964):

Production of antiserum for staphylococcal enterotoxin.

Appl. Microbiol. 12, 363-367

CASMAN, E.P., M.S. BERGDOLL und J. ROBINSON (1963):

Designation of staphylococcal enterotoxins.

J. Bact. 85, 715-716

CASMAN, E.P., R.W. BENNETT, A.E.DORSEY und J.A. ISSA (1967):  
Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D.  
J. Bact. 94, 1875-1882

CHANG, P.-C. und N. DICKIE (1971):  
Fractionation of staphylococcal enterotoxin B by isoelectric focusing.  
Biochim. Biophys. Acta 236, 367-375

CHANG, P.-C., N. DICKIE und F.S. THATCHER (1971a):  
Hydroxyl apatite column chromatography of enterotoxin B.  
Can. J. Microbiol. 17, 296-297

CHANG, P.-C., Y. YANO, M. DIGHTON und N. DICKIE (1971b):  
Fractionation of staphylococcal enterotoxin C<sub>2</sub> by isoelectric focusing.  
Canad. J. Microbiol. 17, 1367-1372

CHANG, H.-C. und M.S. BERGDOLL (1979):  
Purification and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin D.  
Biochemistry 18, 1937-1942

CHU, F.S., K. THADHANI, E.J. SCHANTZ und M.S. BERGDOLL (1966):  
Purification and characterization of staphylococcal enterotoxin A.  
Biochemistry 5, 3281-3289

DANGERFIELD, H.G. (1973):  
Effect of enterotoxins after ingestion by humans.  
Vortrag, Annual Meeting Am. Soc. Microbiol.

DANIELSSON, M.L. und B. HELLBERG (1984):  
Prevalence of enterotoxigenic staphylococci in nose, throat and skin lesions  
in meat-workers.  
Acta Vet. Scand. 25, 242-249

DENNY, C.B., P.L. TAN und C.W. BOHRER (1966):  
Isolation and purification of enterotoxin A by polyacrylamide gel electrophoresis.  
J. Environ. Health 29, 222-230

DE NOOIJ, M.P., W.J. VAN LEEUWEN und S. NOTERMANS (1982):  
Enterotoxin production by strains of *Staphylococcus aureus* isolated from  
clinical and non-clinical specimens with special reference to enterotoxin F  
and toxic shock syndrome.

J. Hyg. Camb. 89, 499-505

DONELLY, C.B., J.E. LESLIE, L.A. BLACK und K.H. LEWIS (1967):  
Serological identification of enterotoxigenic staphylococci from cheese.

Appl. Microbiol. 15, 1382-1387

DUPPEL, W. (1982):

FPLC - schnelle Chromatographie von Proteinen.

J. GIT Lab. Med. 5, 276-282

ENDE, I.A. (1985):

Persönliche Mitteilung.

ENDE, I.A., G. TERPLAN, B. KICKHÖFEN und D.K. HAMMER (1983):  
Chromatofocusing: a new method for purification of staphylococcal entero-  
toxins B and C<sub>1</sub>.

Appl. Environ. Microbiol. 46, 1323-1330

EVANS, J.B., C.A. ANANABA, C.A. PATE und M.S. BERGDOLL (1983):  
Enterotoxin production by atypical *Staphylococcus aureus* from poultry.

J. Appl. Bact. 54, 257-261

EZEPOCHUK, J.V., I.S. NIKOLAEVA und V.I. BUGROVA (1974):

Staphylococcal enterotoxin A: purification and comparative study of the two  
forms (heat-treated and untreated).

Int. J. Biochem. 5, 443-449

EZEPOCHUK, Y.V., S.D. MORGAN und P. MAJOR (1981):

A simple procedure for isolation and purification of A-type *Staphylococcus*  
enterotoxin.

Acta microbiol. Acad. Sci. hung. 28, 25-30

FEY, H., H. PFISTER und C. MÜLLER (1984):

Simple production of staphylococcal enterotoxins (SET) with chromatofocu-  
sing and isoelectrofocusing in flat bed gels.

Zbl. Vet. Med. B, 31, 508-517

FLUER, F.S. (1983):

Isolation of type B staphylococcal enterotoxin and the study of some of its physico-chemical biological and immunological characteristics.

Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunbiol. Nr. 11, 36-41

FLUER, F.S. und G.V. RYBASOVA (1981):

Three-stage procedure for preparation of homogenous staphylococcal enterotoxin of type A.

Lab Delo(12) 746-748

FRANCISCO-POLLEDO, J.J., L.M. GUTIERREZ, M.L. GARCIA und B. MORENO (1983):

Epidemiologic studies of coagulase-positive staphylococci isolated from food handlers.

Microbiol. Esp. 36, 35-43

FREA, J.I., E. McCOY und F.M. STRONG (1963):

Purification of type B staphylococcal enterotoxin.

J. Bact. 86, 1308-1313

GARCIA, M.L., B. MORENO und M.S. BERGDOLL (1980):

Characterization of staphylococci isolated from mastitic cows in Spain.

Appl. Environ. Microbiol. 39, 548-553

GILBERT, R.J. (1974):

Staphylococcal food poisoning and botulism.

Postgraduate Medical Journal 50, 603-611

GIRIJA, U.G. und S. MITHAL (1980):

Enterotoxigenic staphylococci from non-faecal human sources.

Indian J. Med. Res. 71, 688-691

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1978):

Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane.

Anal. Biochem. 89, 60-70

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1979a):

Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung und Ultradünnschicht-Elektrophorese in Polyacrylamidgel auf Folie.

Labor-Medizin 2, 32-40

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1979b):

Ultradünnschicht-isoelektrische Fokussierung in 0,12 mm-Polyacrylamid-Gelen auf Polyesterfolie.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 168, 25-28

GÖRG, A., W. POSTEL und R. WESTERMEIER (1982):

SDS electrophoresis of legume seed proteins in horizontal ultrathin-layer pore gradient gels.

Z. Lebensm. Unters. Forsch. 174, 282-285

GÖRG, A., W. POSTEL, R. WESTERMEIER, E. GIANAZZA und P.G. RIGHETTI (1980):

Gel gradient electrophoresis, isoelectric focusing and two-dimensional techniques in horizontal, ultrathin polyacrylamide layers.

J. Biochem. Methods 3, 273-289

GÖRG, A., W. POSTEL, R. WESTERMEIER, P.G. RIGHETTI und K. EK (1981):

One and two dimensional electrophoresis performed horizontally in ultrathin SDS pore-gradient gels.

LKB Application Note 320; Bromma, Schweden

HAJEK, V. und E. MARSALEK (1973):

The occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains in hosts of different animal species.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 223, 63-68

HALLANDER, H.O. (1963):

Fractionation of staphylococcal toxins by gelfiltration.

Acta path. et microbiol. scand. 59, 543-552

HALLANDER, H.O. (1966):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Acta path. et microbiol. scand. 67, 117-132

HARVEY, J., J.T. PATTERSON und P.A. GIBBS (1982):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry: raw poultry carcasses as a potential food-poisoning hazard.

J. Appl. Bact. 52, 251-258

HILL, B.M. (1983):

Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products.

N. Z. J. Dairy Sci. Tech. 18, 59-62

HOLMBERG, S.D. und P.A. BLAKE (1984):

Staphylococcal food poisoning in the United States.

JAMA, 251, 487-489

HUANG, I.Y. und M.S. BERGDOLL (1970):

The primary structure of staphylococcal enterotoxin B.

J. Biol. Chem. 245, 3493-3510

IGARASHI, H. (1972):

Staphylococcal enterotoxin D. Immunological identification with purified toxin.

Jap. J. Microbiol. 16, 483-491

IGARASHI, H., H. FUJIKAWA, H. USAMI, S. KAWABATA und T. MORITA (1984):

Purification and characterization of *Staphylococcus aureus* FRI 1169 and 587 Toxic Shock Syndrome exotoxins.

Infect. Immun. 44, 175-181

JANIN, F., C. LAPEYRE, M.L. DE BUYSER, F. DILASSER und M.

BOREL (1984):

Purification of *S. aureus* enterotoxins A, C<sub>1</sub> and D by fast protein liquid chromatography (F.P.L.C.), in: ALOUF, J.E., F.J. FEHRENBACH, J.H. FREER und J. JELJASZEWICZ: Bacterial protein toxins, p. 251-252.

Academic Press, London

JARVIS, A.W. und S. HARDING (1972):

Staphylococcal food-poisoning in New Zealand.

N. Z. Med. J. 76, 182-183

KARSCH, W. und U. RICHTER (1979):

Reinigung der Staphylokokken-Enterotoxine A-E.

Z. ges. Hyg. 25, 613-615

KATO, E. und T. KUME (1980):

Enterotoxigenicity of bovine *Staphylococci* isolated from California mastitis test-positive milk in Japan.

Jpn. J. Vet. Res. 28, 75-85

KATO, E., M. KHAN, L. KUJOVICH und M.S. BERGDOLL (1966):

Production of enterotoxin A.

Appl. Microbiol. 14, 966-972

KOLIN, A. (1958):

Rapid electrophoresis in density gradient combined with pH and/or conductivity gradients, in: GLICK, D.: Methods of Biochemical Analysis, Vol. VI, p. 259-288.

Interscience Publishers Inc. New York und London

KUO, J.K. und C. GENIGEORGIS (1978):

Purification of the staphylococcal enterotoxin A and B by affinity chromatography.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (P 47), p. 194

LACHICA, R.V.F., K.F. WEISS und R.H. DEIBEL (1969):

Relationships among coagulase, enterotoxin and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*.

Appl. Microbiol. 18, 126-127

LANGNER, H.-J. (1971):

Probleme bei der Reindarstellung des Staphylokokken-Enterotoxins A.

Fleischwirtschaft 51, 1229-1232

LANGNER, H.-J. und G. KLOSS (1974):

Probleme bei der Reindarstellung des Staphylokokken-Enterotoxins D und bei der Gewinnung von Antiserum D.

Fleischwirtschaft 54, 215-218

LEE, A.C.M., R.N. ROBBINS und M.S. BERGDOLL (1978):

Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins A and E by affinity chromatography.

Infect. Immun. 21, 387-391

LEE, A.C.M., R.N. ROBBINS, R.F. REISER und M.S. BERGDOLL (1980):

Isolation of specific and common antibodies to staphylococcal enterotoxins B, C<sub>1</sub>, and C<sub>2</sub>.

Infect. Immun. 27, 431-434

LOMBAI, G., L. JANOSI, F. KATONA, P. MAJOR, H. MILCH, L. ORMAY und J. TAKACS (1980):

Eigenschaften und lebensmittelhygienische Bedeutung von aus Eutern isolierten *Staphylococcus aureus*-Stämmen.

Arch. Lebensmittelhyg. 31, 206-209

LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR und R.J. RANDALL (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265-275

MANCINI, G., A.O. CARBONARA und J.F. HEREMANS (1965):

Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion.

Immunochem. 2, 235-254

MAUFF, G., I. RÖHRIG, U. ERNZER, W. LENZ, M. BERGDOLL und G. PULVERER (1983):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains from clinical isolates.

Eur. J. Clin. Microbiol. 2, 321-326

MAYER, S. (1975):

Enterotoxinbildungsvermögen boviner und humaner Staphylokokken unter Berücksichtigung der Antibiotikaresistenz und anderer biologischer Eigenschaften.

Vet. Med. Diss., München

MELCONIAN, A.K., J.-P. FLANDROIS und J. FLEURETTE (1983):

Modified method for production and purification of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B.

Appl. Environ. Microbiol. 45, 1140-1143

MERSON, M.H. (1973):

The epidemiology of staphylococcal foodborne disease, in: Proceedings Staphylococci in Foods Conference. University Park, Pa., Pennsylvania State University Press, zit. n. HOLMBERG, S.D. und P.A. BLAKE (1984):

Staphylococcal food poisoning in the United States.

JAMA, 251, 487-489

METZGER, J.F., A.D. JOHNSON und L. SPERO (1975):

Intrinsic and chemically produced microheterogeneity of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type C.

Infect. Immun. 12, 93-97

MEYER, W., H. RISCHE und W. WITTE (1978):

Epidemiologische Überwachung von *Staphylococcus aureus*.

Beiträge zur Hygiene und Epidemiologie 24, 1-123

MEYER, R.F., L. MILLER; R.W. BENNETT und J.D. MACMILLAN (1984):

Development of a monoclonal antibody capable of interacting with five serotypes of *Staphylococcus aureus* enterotoxin.

Appl. Environ. Microbiol. 47, 283-287

MINOR, T.E. und E.H. MARTH (1976):

Staphylococci and their significance in foods.

Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, Oxford und New York

MOCHMANN, H., A.K. AKATOV, M.L. KHATENEVER, U. RICHTER, I.W.

KUSCHKO und W. KARSCH (1981):

Studies on enterotoxin production by strains of *Staphylococcus* of different origin obtained from USSR, in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections, p. 377-380.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

MÜLLER, H., H. PUPPEL, W. MANNHEIM, H. DAJANI und U. v. AHN (1973):

Fäkale Trägerrate und Enterotoxinbildungsvermögen von *Staphylococcus aureus* beim Menschen.

Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 223, 180-196

MÜLLER, C. (1981):

Produktion von Staphylokokken-Enterotoxin D mit der präparativen Isoelektrofokussierung.

Phil. nat. Lic., Universität Bern

NISKANEN, A. und L. KOIRANEN (1977):

Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources.

J. Food Prot. 40, 543-548

NOTERMANS, S. (1982):

Persönliche Mitteilung.

NOTERMANS, S. und J.B. DUFRENNE (1982):

A simple purification method for enterotoxin F produced by *Staphylococcus aureus* and some properties of the toxin.

Antonie van Leeuwenhoek 48, 447-455

NOTERMANS, S., P. TIPS und K.J. HEUVELMAN (1984):

Einfluß der Milieu-Bedingungen auf das Wachstum von *S. aureus* und die Enterotoxin-Bildung.

Fleischwirtschaft 64, 1490-1496

NOTERMANS, S., W.J. VAN LEEUWEN, J. DUFRENNE und P.D. TIPS (1983):

Serum antibodies to enterotoxins produced by *Staphylococcus aureus* with special reference to enterotoxin F and Toxic Shock Syndrome.

J. Clin. Microbiol. 18, 1055-1060.

ODA, T. (1978):

Application of SP-Sephadex chromatography to the purification of staphylococcal enterotoxins A, B and C<sub>2</sub>.

Jap. J. Bact. 33, 743-752

ODA, T. (1980):

Application of SP-Sephadex chromatography to the purification of staphylococcal enterotoxin D and E.

Jap. J. Bact. 35, 559-567

OLSON, J.C., E.P. CASMAN, E.F. BAER und J.E. STONE (1970):

Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* cultures isolated from acute cases of bovine mastitis.

Appl. Microbiol. 20, 605-607

OSVATH-MARTON, A., E. BAN und L. MOLNAR (1976):

Occurrence of enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* strains in enterocolitis of children, in: JELJASZEWICZ, J.: *Staphylococci and staphylococcal diseases*, p. 975-980.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

PALASUNTHERAM, C. und M.S. BEAUCHAMP (1982):

Enterotoxigenic staphylococci in Sri Lanka.

J. Appl. Bact. 52, 39-41

PETRAS, P. und L. MASKOVA (1980):

Detection of staphylococcal enterotoxigenicity. II. Field strains.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 24, 177-182

PETRAS, P. und L. MASKOVA (1982):

Detection of staphylococcal enterotoxigenicity. III. Strains isolated in 1979-1980.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 26, 95-101

PORATH, J. und P. FLODIN (1959):

Gel filtration: a method for desalting and group separation.

Nature 183, 1657-1659

RAJALAKSHMI und K. RAJYALAKSHMI (1982):

Types of enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from cases of food poisoning.

Indian J. Med. Res. 76, 127-129

RASKA, K., V. MATEJOVSKA, D. MATEJOVSKA, M.S. BERGDOLL und P. PETRAS (1981):

To the origin of contamination of foodstuffs by enterotoxigenic staphylococci, in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections, p. 381-385. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

REISER, R.F. und M.S. BERGDOLL (1979):

Unveröffentlichte Ergebnisse, zit. n. BERGDOLL, M.S. (1983):

Enterotoxins, in: EASMON, C.S.F. und G. ADLAM: Staphylococci and staphylococcal infections, Bd. II (The organisms in vivo and in vitro), p. 559-598. Academic Press, London

REISER, R.F., R.N. ROBBINS, G.P. KHOE und M.S. BERGDOLL (1983):

Purification and some physicochemical properties of toxic-shock toxin. Biochemistry 22, 3907-3912

REISER, R.F., R.N. ROBBINS, A.L. NOLETO, G.P. KHOE und M.S. BERGDOLL (1984):

Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C<sub>3</sub>.

Infect. Immun. 45, 625-630

REISFELD, R.A., U.J. LEWIS und D.E. WILLIAMS (1962):

Disc electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature 195, 281-283

RICHTER, U. und W. KARSCH (1980):

Herstellung diagnostischer Antiseren zum Nachweis der Staphylokokken-Enterotoxine A - E.

Z. ges. Hyg. 26, 53-55

RICHTER, U., W. WITTE, R. HUMMEL, W. KARSCH und H. MOCHMANN (1981):

Enterotoxin production and host specific variety by Staphylococcus aureus strains, in: JELJASZEWICZ, J.: Staphylococci and staphylococcal infections, p. 1023-1027.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

ROBBINS, R., S. GOULD und M.S. BERGDOLL (1974):

Detecting the enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains.

Appl. Microbiol. 28, 946-950

ROBERN, H., S. STAVRIC und N. DICKIE (1975a):

The application of QAE-Sephadex for the purification of two staphylococcal enterotoxins. I. Purification of Enterotoxin C<sub>2</sub>.

Biochim. Biophys. Acta 393, 148-158

ROBERN, H., S. STAVRIC und N. DICKIE (1975b):

The application of QAE-Sephadex for the purification of two staphylococcal enterotoxins. II. Purification of enterotoxin A.

Biochim. Biophys. Acta 393, 159-164

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, J. WAGMAN, L. SPERO, D.A. DUNNERY und M.S. BERGDOLL (1965):

Purification of staphylococcal enterotoxin B.

Biochemistry 4, 1011-1016

SCHANTZ, E.J., W.G. ROESSLER, M.G. WOODBURN, J.M. LYNCH, H.M.

JACOBY, S.J. SILVERMAN, J.C. GORMAN und L. SPERO (1972):

Purification and some chemical and physical properties of staphylococcal enterotoxin A.

Biochemistry 11, 360-366

SCHMIDT, J.J. und L. SPERO (1983):

The complete amino acid sequence of staphylococcal enterotoxin C<sub>1</sub>.

J. Biol. Chem. 258, 6300-6302

SHINAGAWA, K., N. KUNITA und G. SAKAGUCHI (1975):

Simplified methods for purification of staphylococcal enterotoxins A and C and preparation of anti-enterotoxin sera.

Jap. J. Bact. 30, 683-692

SHINAGAWA, K., H. KUNITA und G. SAKAGUCHI (1977):

Purification of staphylococcal enterotoxin E and antigenic similarity between enterotoxin A and E.

Jap. J. Bact. 32, 829-836

SHIOZAWA, K., E. KATO und A. SHIMIZU (1980):

Enterotoxigenicity of Staphylococcus aureus strains isolated from chickens.

J. Food Prot. 43, 683-685.

SIMKOVICOVA, M. und R.J. GILBERT (1971):

Serological detection of enterotoxin from food-poisoning strains of Staphylococcus aureus.

J. Med. Microbiol. 4, 19-30

SINELL, H.-J. (1985):

Einführung in die Lebensmittelhygiene, p. 40.

Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg

SMITH, J.L., R.L. BUCHANAN und S.A. PALUMBO (1983):

Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: a review.

J. Food Prot. 46, 545-555

SOBER, H.A., R.W. HARTLEY Jr., W.R. CARROLL und E.A. PETERSON (1965):

Fractionation of proteins, in: NEURATH, H.: The proteins, Bd. III, p. 2-97.

Academic Press, New York und London

SOMMERFELD, P. und G. TERPLAN (1975):

Methoden zum Nachweis von Staphylokokkenenterotoxinen.

Arch. Lebensmittelhyg. 26, 128-137

SOO, H.M., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1973):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins A and D.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (E2), p. 1

SOO, H.M., S.R. TATINI und R.W. BENNETT (1974):

Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxins A and D in certain foods.

Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. (E81), p. 14

SOUREK, J. (1980):

Circulation of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* in humans and their environment.

J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol. 24, 183-191

SOUREK, J., F. VYMOLA, M. TROJANOVA, L. ZELENKOVA, V. MATE-JOVSKA und M.S. BERGDOLL (1979):

Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from cases of chronic osteomyelitis.

J. Clin. Microbiol. 9, 266-268

SPERO, L., J.R. WARREN und J.F. METZGER (1974):

Microheterogeneity of staphylococcal enterotoxin B.

Biochim. Biophys. Acta 336, 79-85

SURGALLA, M.J., M.S. BERGDOLL und G.M. DACK (1954):

Staphylococcal enterotoxin: neutralization by rabbit antiserum.

J. Immunol. 72, 398-403

SVENSSON, H. (1961):

Isoelectric fractionation, analysis and characterization of ampholytes in natural pH gradients. The differential equation of solute concentrations at a steady state and its solution for simple cases.

Acta Chem. Scand. 15, 325-341

SVENSSON, H. (1962):

Isoelectric fractionation and characterization of Ampholytes in natural pH gradients. II. Buffering capacity and conductance of isoionic ampholytes.

Acta Chem. Scand. 16, 456-466

TAN, P.L., C.B. DENNY, W.R. HEILMAN und C.W. BOHRER (1969):

New technique for rapid purification, entrapment, and recovery of enterotoxin A from a liquid chamber by polyacrylamide gel electrophoresis.

Appl. Microbiol. 18, 1089-1090

TATINI, S.R. (1976):

Thermal stability of enterotoxins in food.

J. Milk Food Technol. 39, 432-438

TATINI, S.R., B. CORDS, L.L. McKAY und R.W. BENNETT (1971):  
Effect of growth temperatures higher than optimal on production of staphylococcal enterotoxins and deoxyribonuclease.

Bact. Proc. (A 101), p. 17

TERAYAMA, T., H. IGARASHI, H. USHIODA und H. ZEN-YOJI (1972):  
Studies on staphylococcal food poisoning (III). Enterotoxin productivity and coagulase types of strains of *Staphylococcus aureus* originated from food poisoning incidents, healthy subjects and commercial foods.

J. Food Hyg. Soc. Jap. 13, 549-554

TERAYAMA, T., S. YAMADA, H. IGARASHI, H. USHIODA und H. ZEN-YOJI (1974):

Purification of staphylococcal enterotoxin E.

Ann. Rep. Tokyo Metr. Res. Lab. P.H. 25, 9-15

TERPLAN, G., K.-J. ZAADHOF und S. BOBETH (1971):

Zum Vorkommen und Nachweis von enterotoxinbildenden Staphylokokken in Milch.

Alimenta Sonderausgabe 1971, 51-56

THOMPSON, N.E., M.J. KETTERHAGEN und M.S. BERGDOLL (1984):

Monoclonal antibodies to staphylococcal enterotoxins B and C: Cross-reactivity and localization of epitopes on tryptic fragments.

Infect. Immun. 45, 281-285

TOSHACH, S. und S. THORSTEINSON (1972):

Detection of staphylococcal enterotoxin by the gel diffusion test.

Canad. J. Public Health 63, 58-66

UNTERMANN, F. (1972):

Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken bei Mensch und Tier und ihre lebensmittelhygienische Bedeutung.

Zbl. Vet. Med., Beiheft 17

UNTERMANN, F. (1974):

Erreger bakterieller Lebensmittelintoxikationen in Milch und Milchprodukten.

Wien. tierärztl. Mschr. 61, 37-44

UNTERMANN, F. (1980):

Staphylokokken-Enterotoxine, in: BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER: Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd. II, p. 131-159.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart und New York

UNTERMANN, F. und H.-J. SINELL (1970):

Beitrag zum Vorkommen enterotoxinbildender Staphylokokken.

Zbl. Bakt., I. Abt. Orig. 215, 166-172

UNTERMANN, F., D. KUSCH und H. LUPKE (1973):

Zur Bedeutung der Mastitis-Staphylokokken als Ursache von Lebensmittelvergiftungen.

Milchwissenschaft 28, 686-688

WADSTRÖM, T., M. THELESTAM und R. MÖLLBY (1974):

Biological properties of extracellular proteins from Staphylococcus.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 236, 343-361

WIENEKE, A.A. (1974):

Enterotoxin production by strains of Staphylococcus aureus isolated from foods and human beings.

J. Hyg. Camb. 73, 255-262

WILLIAMS, R.R., C.T. WEHR, T.J. ROGERS und R.W. BENNETT (1983):

High-performance liquid chromatography of staphylococcal enterotoxin B.

J. Chromatogr. 266, 179-186

WINDYGA, B. (1978):

Occurrence of enterotoxigenic staphylococci, especially producers of enterotoxins D and E among strains isolated from food.

Acta Alimentaria Polonica 4, 129-132

YAMADA, S. (1977a):

Studies on staphylococcal enterotoxins. I. Purification of staphylococcal enterotoxins A, B, C<sub>2</sub>, D and E.

Bull. Azabu Vet. Coll. 2, 17-29

YAMADA, S. (1977b):

Studies on staphylococcal enterotoxins. II. Characterization of staphylococcal toxins, and incidence of the toxin-producing strains of the organism.

Bull. Azabu Vet. Coll. 2, 31-46

YAMADA, S., H. IGARASHI und T. TERAYAMA (1976):

Purification and some properties of enterotoxin A produced by *Staphylococcus aureus* strain 100 mutant.

Jap. J. Bact. 31, 409-419



Bei Herrn Prof. Dr. G. Terplan möchte ich mich an dieser Stelle für die Überlassung des Dissertationsthemas herzlich bedanken. Seine verständnisvolle Unterstützung bei anfallenden Problemen war eine wertvolle Hilfe bei der Durchführung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. J. Meyer für seine Unterstützung bei der Unterbringung der Schafe im Lehr- und Versuchsgut Oberschleißheim.

Bei Herrn K.-H. Friedrich bedanke ich mich für die Hilfe beim Fertigstellen des schriftlichen Teils der Dissertation.

Weiterhin danke ich Frau Hill und Herrn Dr. K.-H. Jaschke, die bei der Durchführung der praktischen Arbeiten halfen, sowie Frau E. Spensberger für das Schreiben der Arbeit.

## Lebenslauf

- 1957 geboren am 4. Februar in Fulda/Hessen
- 1964 - 1967 Besuch der Grundschule in Gichenbach/Rhön und in Gersfeld/Rhön
- 1967 - 1971 Besuch des Gymnasiums in Heppenheim a.d.B.
- 1971 - 1976 Besuch des Gymnasiums in Fulda
- 1976 23. Mai Abitur
- 1976 - 1979 Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
- 1979 - 1982 Studium der Tiermedizin an der Freien Universität in Berlin
- 1982 4. August Approbation als Tierärztin
- 1982 - 1985 Tätigkeit als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Ludwig-Maximilians-Universität München (Prof. Dr. G. Terplan).



